

FR 2696189

1/9/1

DIALOG (R) File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.
009848430

WPI Acc No: 1994-128286/199416 XRAM Acc No: C94-059038

**DNA involved in streptogramin antibiotic biosynthesis - for prodn. or
bio-conversion of streptogramin(s) or prodn. of streptogramin
intermediates, derivs. or hybrid antibiotics**

Patent Assignee: RHONE-POULENC RORER SA (RHON); RHONE POULENC RORER SA (RHON); AVENTIS PHARMA SA (AVET); BLANC V (BLAN-I); BLANCHE F (BLAN-I); CROUZET J (CROU-I); DE CRECY-LAGARD V (DCRE-I); DEBUSSCHE L (DEBU-I); JACQUES N (JACQ-I); LACROIX P (LACR-I); THIBAUT D (THIB-I); ZAGOREC M (ZAGO-I)

Inventor: BLANC V; BLANCHE F; CROUZET J; JACQUES N; LACROIX P; THIBAUT D; ZAGOREC M; THIBEAULT D; DE CRECY-LAGARD V; DEBUSSCHE L; DE CRECY-LAGARDE V; LA-CROIX P; COUZET J

Number of Countries: 025 Number of Patents: 016

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2696189	A1	19940401	FR 9211441	A	19920925	199416 B
WO 9408014	A1	19940414	WO 93FR923	A	19930925	199416
ZA 9307102	A	19940629	ZA 937102	A	19930924	199428
AU 9348239	A	19940426	AU 9348239	A	19930925	199432
FI 9501403	A	19950324	WO 93FR923	A	19930925	199525
			FI 951403	A	19950324	
EP 662134	A1	19950712	EP 93920919	A	19930925	199532
			WO 93FR923	A	19930925	
JP 8501696	W	19960227	WO 93FR923	A	19930925	199643
			JP 94508766	A	19930925	
NZ 256053	A	19970324	NZ 256053	A	19930925	199719
			WO 93FR923	A	19930925	
AU 9861891	A	19980611	AU 9348239	A	19930925	199834
			AU 9861891	A	19980414	
AU 692138	B	19980604	AU 9348239	A	19930925	199839
US 5891695	A	19990406	WO 93FR923	A	19930925	199921
			US 95403852	A	19950510	
US 6077699	A	20000620	WO 93FR923	A	19930925	200035
			US 95403852	A	19950510	
			US 95510646	A	19950803	
US 6171846	B1	20010109	WO 93FR923	A	19930925	200104
			US 95403852	A	19950510	
			US 99231818	A	19990115	
CA 2145523	C	20030603	CA 2145523	A	19930925	200344
			WO 93FR923	A	19930925	
KR 359226	B	20030418	WO 93FR923	A	19930925	200359
			KR 95701157	A	19950324	
US 6670157	B1	20031230	WO 93FR923	A	19930925	200402 N
			US 95403852	A	19950510	
			US 99231818	A	19990115	
			US 2000635359	A	20000809	

Priority Applications (No Type Date): FR 9211441 A 19920925; US 2000635359
A 20000809

Cited Patents: 9.Jnl.Ref; JP 59059198

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

FR 2696189 A1 83 C12N-015/31
WO 9408014 A1 C12N-015/52

Designated States (National): AU CA FI JP KR NZ US
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL
 PT SE
 ZA 9307102 A 230 C12N-000/00
 AU 9348239 A C12N-015/52 Based on patent WO 9408014
 FI 9501403 A C07K-000/00
 EP 662134 A1 F C12N-015/52 Based on patent WO 9408014
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
 PT SE
 JP 8501696 W 194 C12N-015/09 Based on patent WO 9408014
 NZ 256053 A C07H-021/00 Based on patent WO 9408014
 AU 9861891 A C07C-211/46 Div ex application AU 9348239
 AU 692138 B C12N-015/31 Previous Publ. patent AU 9348239
 Based on patent WO 9408014
 US 5891695 A C12N-009/00 Based on patent WO 9408014
 US 6077699 A C12N-009/00 CIP of application WO 93FR923
 CIP of application US 95403852
 US 6171846 B1 C12N-001/20 Div ex application WO 93FR923
 Div ex application US 95403852
 Div ex patent US 5891695
 CA 2145523 C F C12N-015/52 Based on patent WO 9408014
 KR 359226 B C12N-015/52 Previous Publ. patent KR 95703646
 Based on patent WO 9408014
 US 6670157 B1 C12P-017/14 Div ex application WO 93FR923
 Div ex application US 95403852
 Div ex application US 99231818
 Div ex patent US 5891695
 Div ex patent US 6171846

Abstract (Basic): FR 2696189 A

Nucleotide sequences (I) coding for a polypeptide involved in the biosynthesis of streptogramins are new.

Also claimed are: (1) recombinant DNA (II) comprising a gene for streptogramin biosynthesis; (2) expression vectors (III) capable of autonomic and/or integrative replication, comprising (I) or (II); (3) recombinant cells contg. (I), (II) and/or (III); (4) mutants of streptogramin-producing microorganisms, with a genetic modification in a gene involved in streptogramin biosynthesis; (5) polypeptides resulting from the expression of (I) or (II); and (6) polypeptides comprising all or part of polypeptides SnaA, SnaB, SnaC, SnbA and SnbR or their derivs.

USE - The recombinant cells can be cultured to produce streptogramins esp. pristinamycins, mikamycins or virginiamycins, which are antibiotics, esp. active against Gram-positive bacteria (see Microbiol. Rev., 43, 145, 1979). Mutant microorganisms in which a step in the streptogramin biosynthetic pathway is blocked can be cultured to produce streptogramin intermediates, which may be converted to streptogramin derivs. The recombinant cells may also be used for bioconversion of streptogramin (from one form to another) or for prodn. of hybrid antibiotics.

Dwg.4/11

Title Terms: DNA; ANTIBIOTIC; BIOSYNTHESIS; PRODUCE; BIO; CONVERT; PRODUCE; INTERMEDIATE; DERIVATIVE; HYBRID; ANTIBIOTIC

Derwent Class: B04; D16

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 696 189

(21) N° d'enregistrement national : 92 11441

(51) Int Cl⁵ : C 12 N 15/31, 15/81, 15/01, C 12 P 21/02

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.09.92.

(71) Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —
FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 01.04.94 Bulletin 94/13.

(72) Inventeur(s) : Blanc Véronique, Blanche Francis,
Crouzet Joël, Jacques Nathalie, Lacroix Patricia,
Thibaut Denis et Zagorec Monique.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(74) Mandataire :

(54) Polypeptides impliqués dans la biosynthèse des streptogramines, séquences nucléotidiques codant pour
ces polypeptides et leur utilisation.

(57) La présente invention concerne les séquences nucléo-
tidiques codant pour un polypeptide impliqué dans la bio-
synthèse des Streptogramines, les cellules recombinantes
contenant de telles séquences, et leurs utilisations.

FR 2 696 189 - A1



POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHÈSE DES STREPTOGRAMINES. SEQUENCES
NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET LEUR UTILISATION.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines et comprend également l'isolement et l'identification 5 de gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines, l'expression de ces gènes dans le but d'augmenter les taux de production et leur utilisation pour la construction de mutants bloqués pouvant conduire à la synthèse de nouveaux antibiotiques ou à des formes dérivées de Streptogramines

Les Streptogramines forment un groupe homogène d'antibiotiques constitués 10 d'une association de deux types de molécules chimiquement différentes; d'une part des macrolactones polyinsaturées (composants du groupe A, dont deux exemples de structures sont présentées figure 1) et d'autre part, des depsipeptides (composants du groupe B, dont trois exemples de structure sont présentés sur la figure 2). Ce groupe comprend de nombreux antibiotiques (cf. tableau 1) connus sous différents noms en 15 fonction de leur origine dont les Pristinamycines, les Mikamycines, les Virginiamycines (pour une revue, voir Cocito 1979, 1983).

Les composants A et B ont une activité antibactérienne synergique qui peut atteindre 100 fois celle des composants séparés et qui, contrairement à celle de chaque 20 composant, est bactéricide (Cocito 1979). Cette activité est plus particulièrement efficace contre les bactéries Gram-positives, comme les Staphylocoques et Streptocoques (Cocito 1979, Videau 1982). Les composants A et B inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome (Cocito 1979 ; pour une revue, voir Di Giambattista *et al.* 1989).

Les Streptogramines sont essentiellement produites par des Actinomycètes dont 25 de nombreux Streptomycètes, présentés dans le tableau 1. En outre, les Streptogramines sont aussi synthétisées par des eucaryotes tel que Micromonospora qui synthétise les Vernamycines. Les Actinomycètes constituent un groupe de microorganismes très intéressant du fait de la quantité importante de métabolites secondaires qu'ils produisent, parmi lesquels de nombreux antibiotiques (Beta-30 lactames, Tétracyclines, Macrolides, Aminoglycosides, Polyacétates, etc), des herbicides, des anti-cancéreux, des antifongiques, des immunomodulateurs, des inhibiteurs d'enzymes. De nombreuses voies de biosynthèse, concernant des antibiotiques appartenant à des classes variées ainsi que d'autres métabolites secondaires tels que des pigments (pour une revue, Chater 1990), ont à ce jour déjà

été étudiées chez les Actinomycètes. Un aspect important de ce groupe de bactéries, est que les gènes impliqués dans une même voie de biosynthèse, gènes de structure, mais également, gène(s) de résistance et gène(s) de régulation, sont groupés physiquement sur le chromosome, constituant des clusters, pouvant atteindre plus de 5 100 Kb (Hopwood *et al.* 1986a, Hopwood *et al.* 1986b, Hallam *et al.* 1988, Anzai *et al.* 1987, Onuki *et al.* 1985b). A ce jour aucun exemple n'est venu contredire cette 10 constatation. Une telle organisation structurale présente un intérêt important dans le développement des stratégies de clonage des gènes de biosynthèse. En effet, il est possible, à partir d'un seul gène préalablement cloné par des techniques diverses, gène de biosynthèse, de résistance ou de régulation, de marcher le long du chromosome et d'isoler ainsi l'ensemble des gènes du cluster de biosynthèse.

La connaissance des voies de biosynthèse de chacun des composants des Streptogramines n'est que très partielle à ce jour, mais l'origine des différentes parties de chaque molécule a été identifiée par marquage radioactif (Kingston *et al.* 1983). 15 Ainsi, les composants de type A sont formés de deux régions provenant de la condensation d'acétates et de plusieurs acides aminés tels que la sérine, la glycine, par exemple. En ce qui concerne les composants de type B, des études ont montré que tous les acides aminés présents dans la chaîne peptidique dérivent des acides aminés naturels (Hook et Vining 1973). Toutefois, aucun polypeptide impliqué dans ces 20 voies n'a été purifié en quantité suffisante à ce jour pour permettre sa caractérisation moléculaire, et aucun gène de biosynthèse n'a été décrit.

La présente invention résulte de la purification de polypeptides intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines ainsi que du clonage de gènes dont le produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines. La présente invention permet 25 ainsi d'augmenter les taux de production de ces métabolites grâce aux techniques d'ADN recombinant. Un autre intérêt de la présente invention réside dans la possibilité, par construction de mutants bloqués dans les différentes étapes de cette biosynthèse, de produire des intermédiaires de synthèse de chacun des deux composants. Ces intermédiaires peuvent servir de substrats à de nouvelles 30 modifications, par voie chimique, biochimique, enzymatique ou microbiologique. De même l'isolement des gènes de biosynthèse permet, par transfert des gènes entre souches productrices, de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989). Un autre intérêt de la présente invention réside dans le fait 35 qu'elle apporte une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des métabolites

classés comme des Streptogramines. En effet, l'invention permet de construire des souches bactériennes ou fongiques dans lesquelles on exprime, sous le contrôle de signaux d'expression appropriés, une ou plusieurs protéines intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines. De telles souches peuvent alors être utilisées pour 5 réaliser des bioconversions. Ces bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires des dites cellules. Ces bioconversions peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée, avec une enzyme d'une voie de biosynthèse. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même 10 raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de biosynthèse.

Un premier objet de l'invention concerne donc une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

Plus particulièrement, plusieurs gènes dont le produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines ont été isolés à partir de Streptomyces pristinaespiralis. Les Streptogramines produites par cette souche étant plus communément désignées par le terme Pristinamycines (Cf tableau 1), dans ce qui suit, référence sera faite dans certains cas aux gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Mais il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines. Les Pristinamycines I et II correspondent respectivement aux 15 composants B et A des Streptogramines. Les molécules de la famille des Pristinamycines II et de la famille des Pristinamycines I, désignent donc dans ce qui suit les composants A et B des Streptogramines respectivement.

La présente invention décrit en particulier l'isolement et la caractérisation des gènes snaA, snaB, snaC, snbA et snbR. Ces gènes ont été isolés à partir d'une banque 20 d'ADN génomique de S. pristinaespiralis. Cette banque a été obtenue par digestion partielle de l'ADN génomique de S. pristinaespiralis, par l'enzyme de restriction Sau3A. De larges fragments d'ADN, de 40 à 50 Kb en moyenne, ont été clonés dans le cosmid pHC79 (Hohn, B., and Collins, J. F., 1980). Après encapsidation *in vitro*, les souches d'E.coli HB101 (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969) et DH1 (Low, 1968) 25 ont été transfectées. La banque d'ADN de S. pristinaespiralis se trouve ainsi dans deux souches différentes d'E.coli.

Les gènes snaA, snaB et snaC sont présents sur le cosmid pIBV1 (figure 4). Le produit des gènes snaA et snaB, correspondant aux polypeptides SnaA et SnaB, intervient dans la dernière étape de biosynthèse du composant II des Pristinamycines 30 (conversion de la Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA) correspondant à

l'oxydation de la liaison 2,3 de la D-proline. Ces deux polypeptides constituent les deux sous-unités de Pristinamycine II A synthase dont la purification est décrite dans la présente invention. Le produit du gène snaC interviendrait dans la synthèse de la SAM (donneur de groupements méthyls) à partir d'ATP et de méthionine. Le 5 composant A de la plupart des Streptogramines est en effet méthylé en C-4 (figure 1), et il a été décrit (Kingston *et al.*, 1983) que ce méthyl dérive du méthyl de la méthionine, très probablement via une réaction de méthylation avec la SAM. Le gène snaC coderait donc pour une SAM synthase (EC. 2.5.1.6) spécifique de la voie de biosynthèse des Pristinamycines.

10 Les gènes snbA et snbR sont présents sur le cosmid pIBV2 (figure 5). Le gène snbA correspond, d'après les études biochimiques présentées dans l'exemple 5, à la première étape de la synthèse des Pristinamycines I. Il s'agit de l'activation du premier acide de la chaîne, l'acide 3-hydroxypicolinique, par adénylation. Le gène snbR pourrait intervenir dans le transport des molécules de la famille des Pristinamycines I 15 (voire des Pristinamycines II) hors de la cellule, après synthèse, conférant ainsi, à la souche productrice une résistance à ce composant.

20 Ces différents gènes ont été sous-clonés à partir de leur cosmid d'origine et leurs séquences nucléiques ont été déterminées. Les gènes snaA, snaB et snaC, ont été sous-clonés sur un fragment BamHI-BamHI de 6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 1). Le gène snbA a été sous cloné sur un fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 8). Le gène snbR a été sous cloné sur un fragment BglII-BglII de 4.6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 10).

25 La proximité des gènes snaA, snaB et snaC ainsi que des gènes snbA et snbR, confirme la localisation en clusters des gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines. Il est donc évident que les régions qui entourent les gènes identifiés dans la présente invention (snaA, snaB et snaC, snbA et snbR), contiennent les autres gènes du cluster de biosynthèse des Pristinamycines, et que ces gènes peuvent être utilisés pour localiser les autres gènes de biosynthèse des Streptogramines.

30 Préférentiellement, l'invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie parmi :

(a) les gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4), snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10),

(b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,

(c) les séquences hybrideant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,

(d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques représentées par les gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4),
10 snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10).

Un autre objet de l'invention concerne tout ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un ADN recombinant comprenant tout ou partie des cosmides pIBV1 ou pIBV2 tels que représentés sur les figures 4 et 5 ou tout ou partie de séquences hybrideant avec les 15 cosmides pIBV1 ou pIBV2 ou avec des fragments de ceux-ci.

Dans un mode préféré de l'invention, les séquences nucléotidiques définies ci-dessus font partie d'un vecteur d'expression, qui peut être à réplication autonome ou intégratif.

Comme indiqué plus haut, bien que l'invention soit plus particulièrement 20 illustrée avec les gènes de biosynthèse de la Pristinamycine, il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines.

Plus particulièrement, les techniques développées dans la présente invention pour purifier des protéines ou cloner des gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de S.pristinaespiralis peuvent être appliquées aux autres microorganismes 25 producteurs de Streptogramines (Cf tableau 1).

Ainsi, la purification d'une activité enzymatique à partir de S. pristinaespiralis rend possible la purification de la même activité à partir d'une autre souche productrice de Streptogramine. La présente invention peut donc être appliquée au clonage de gènes de biosynthèse de Streptogramine à partir de tout microorganisme 30 producteur par purification d'une protéine intervenant dans la biosynthèse puis, à l'aide de la séquence NH₂-terminale de celle-ci, synthèse d'une sonde oligonucléotique qui permet de cloner le gène correspondant. Ensuite une marche sur le chromosome permet d'identifier le cluster de biosynthèse en entier.

De plus, à partir des gènes identifiés dans la présente demande, il est possible, par hybridation, de cloner directement les gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de l'ADN d'un autre microorganisme producteur. En effet, les gènes de biosynthèse des Pristinamycines hybrident fortement à ceux des autres 5 Streptogramines. Il est ainsi possible de cloner par hybridation les gènes de biosynthèse des Streptogramines en utilisant comme sonde les gènes sna ou snb, ou des fragments de ceux-ci, ou les fragments adjacents à ceux-ci contenant, comme il est montré dans la présente invention, d'autres gènes sna et snb. Ceci résulte du fait que (1) les Streptogramines produites par les différents microorganismes ont des 10 structures identiques ou similaires (voir figure 3), (2) les gènes de biosynthèse des Streptogramines sont organisés en clusters, et (3) les systèmes enzymatiques responsables de cette biosynthèse n'ont pas une spécificité absolue pour leurs substrats.

Par ailleurs, le clonage de gènes impliqués dans la biosynthèse des 15 Streptogramines peut aussi se faire en utilisant des oligonucléotides dégénérés, préparés à partir des séquences des gènes sna ou snb cités plus haut, ou des fragments de ces gènes, ou des fragments contigus à ces gènes. Il est ainsi possible d'aller piocher les gènes de biosynthèse des composants A et B des différentes souches productrices de Streptogramines. Ces souches peuvent faire partie du genre 20 Streptomyces, mais aussi d'autres genres (Cf tableau 1). En outre, si l'ADN génomique des souches de départ utilisées a une composition en G+C différente de celle observée chez les Streptomyces les sondes utilisées peuvent être synthétisées avec un biais de codon spécifique du genre ou de l'espèce à partir duquel on veut isoler l'ADN.

25 Un autre objet de la présente invention concerne les polypeptides résultant de l'expression des séquences nucléotidiques définies ci-dessus. Plus particulièrement, la présente invention concerne les polypeptides comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 3), SnaB (SEQ ID n° 5), SnaC (SEQ ID n° 7), SnbA (SEQ ID n° 9) et SnbR (SEQ ID n° 11) ou de dérivés de ceux-ci. Au sens de la 30 présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter 35 l'affinité du peptide pour son(ses) substrat(s), celui d'améliorer ses niveaux de

production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le 5 terme dérivé comprend également les polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires et notamment de souches productrices de Streptogramines.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique ou un vecteur tel que défini ci-avant. Les cellules 10 recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les 15 cellules COS, CHO, Cl27, les œufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement Micromonospora, Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes 20 Actinomycètes, E.coli, Bacillus, et notamment Streptomyces. Préférentiellement, les cellules recombinantes de l'invention sont choisies parmi les cellules productrices de Streptogramines (Cf tableau 1). Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire une séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

25 L'invention a encore pour objet un procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines selon lequel on cultive une cellule recombinante telle que définie ci-avant et on récupère le polypeptide produit.

30 L'invention a également pour objet l'utilisation d'une cellule recombinante telle que définie ci-avant exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion. En particulier, ces cellules peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de

5 biosynthèse. Ces cellules peuvent également permettre de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood et al. 1985a, Hopwood et al. 1985b, Hutchinson et al. 1989). Ces bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires des dites cellules.

10 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant pour amplifier la production de Streptogramine. L'invention concerne également un procédé de production de Streptogramines selon lequel on introduit et/ou on amplifie dans une cellule productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention, on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et on récupère les Streptogramines produites.

15 La surexpression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse peut permettre l'augmentation de la production des Streptogramines A et/ou B des souches productrices. Cette surproduction peut se faire dans plusieurs souches : soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des Streptogramines A, soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des Streptogramines B, soit des souches qui produisent les deux composants A et B. Ces surexpressions peuvent résulter de l'augmentation du taux de synthèse, donc de la productivité, des composants A et/ou B soit en erlenmeyer, soit en petits fermenteurs, soit en gros fermenteurs industriels. Par ailleurs, la surexpression spécifique d'un gène impliqué dans la biosynthèse d'un composant A ou B permet également de faire varier le % de composants A et B produits par la souche, et ainsi d'obtenir une meilleure synergie entre ces molécules. En outre, les gènes de biosynthèse isolés à partir d'un 20 microorganisme producteur de Streptogramines peuvent être utilisés pour amplifier la production dans un autre microorganisme producteur.

30 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon lequel on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramines, une mutagénèse au niveau d'un gène au moins de la voie de biosynthèse.

Préférentiellement, la mutagénèse est effectuée in vitro ou in situ, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

Un autre aspect de la présente invention réside en effet dans la construction de 5 mutants bloqués dans certaines étapes de biosynthèse des Streptogramines. L'intérêt réside d'une part dans l'étude de la fonctionnalité des protéines mutées et d'autre part dans la réalisation de souches produisant des intermédiaires de biosynthèse. Ces intermédiaires peuvent être modifiés, éventuellement après séparation, soit par ajout de composants particuliers dans les milieux de production, soit par introduction dans 10 les souches ainsi mutées d'autres gènes susceptibles de modifier l'intermédiaire en s'en servant de substrat. Ces intermédiaires peuvent ainsi être modifiés par voie chimique, biochimique, enzymatique et/ou microbiologique. Dans ce cadre, le mutant SP92::pVRC505 de la souche S.pristinaespiralis SP92 a été construit : 15 S.pristinaespiralis SP92::pVRC505 a été isolée par intégration homologue dans le gène snaA d'un plasmide suicide pVRC505, construit à partir du vecteur pDH5 et d'un fragment interne au gène snaA.

L'invention concerne donc également un procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines selon lequel :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des 20 Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines selon lequel :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des 25 Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et,
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

30 La présente invention est illustrée à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemple de structure des composants A des Streptogramines.
 Figure 2 : Exemple de structure des composants B des Streptogramines.
 Figure 3 : Autres exemples de structures de Streptogramines.
 5 Figure 4 : Représentation du cosmid pIBV1.
 Figure 5 : Représentation du cosmid pIBV2.
 Figure 6 : Réaction catalysée par la Pristinamycine IIA-synthase.
 Figure 7 : Réaction catalysée par l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.
 Figure 8 : Représentation des plasmides pVRC402 (A) et pVRC501 (B).
 10 Figure 9 : Représentation du plasmide pXL2045.
 Figure 10 : Représentation du plasmide pVRC505.
 Figure 11 : Représentation du plasmide pVRC507.

Matériels:

Bio-Sil SEC 125 et 250 (Bio-Rad)
 15 Centricon 10 (Amicon)
 Centriprep 10 (Amicon)
 FMN agarose (Sigma)
 MonoQ HR 5/5 et 10/10 (Pharmacia)
 PD-10 (Pharmacia)
 20 Phenyl Sepharose (Pharmacia)
 Phenyl Superose HR 10/10 (Pharmacia)
 Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)
 Sephadex G25 Fine (Pharmacia)
 Superose 12 prep grade (Pharmacia)
 25 Vydac C4 et C18 (The Separations Group)

EXAMPLE 1 : Isolement de l'ADN total de la souche Streptomyces pristinaespiralis SP92.

Cet exemple illustre comment l'ADN de S. pristinaespiralis SP92 peut être purifié.
 30 La souche Streptomyces pristinaespiralis SP92 dérive de la souche Streptomyces pristinaespiralis DS5647 (ATCC25486).

50 ml de milieu YEME (34% de sucrose, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25% (D. Hopwood *et al.* 1985)) sont inoculés avec 10⁸ spores de *S.pristinaespiralis* SP92 et la culture est incubée 40 heures à 30°C, sous agitation de 280 tours/mn.

Le mycélium est récolté et lavé avec 15 ml de saccharose 10.3 %. Environ 1 g du culot de mycélium est repris par 5 ml de TE complémenté par 34 % de sucrose, auxquels sont ajoutés, 1 ml de lysozyme à 50 mg/ml dans une solution de Tris-HCl 0.01 M pH8 et 1 ml d'EDTA 0.25 M pH8. Après incubation à 30°C pendant une durée de 30 à 60 mn, le mélange est éclairci par 0.8 ml de sarkosyl 10 %. Puis sont ajoutés, 2 ml d'EDTA 0.25 M pH8, 10 ml de TE, 18 g de CsCl et 1.2 ml de BET 10 mg/ml. La préparation est ultracentrifugée pendant une nuit à 55 000 tours/mn, à 20°C.

15 L'ADN chromosomique présent dans le gradient de CsCl sous forme d'une bande, est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. Le BET est éliminé par plusieurs lavages avec une solution d'isopropanol saturée par du tampon TE, 5 M NaCl. L'ADN est précipité par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après lavage à l'éthanol 70 %, l'ADN est repris dans un volume approprié de TE. La quantité d'ADN total obtenu varie entre 250 et 500 µg par g de mycélium.

EXEMPLE 2 : Isolement d'ADN plasmidique d'*E.coli* :

20 Cet exemple illustre comment l'ADN plasmidique d'*E.coli* est préparé à partir des souches d'*E.coli* recombinantes

2.1. Préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli* en grosses quantités :

Cet exemple illustre comment les maxipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez *E.coli*.

25 Cette préparation est effectuée à partir d'une culture de 500 ml en milieu LB contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le protocole d'extraction est dérivé des méthodes décrites par Birnboim et Doly (1979) et Ish-Horowicz et Burke (1981) et est décrit dans Maniatis *et al.* (1989).

30 Après cette extraction, l'ADN plasmidique est purifié par gradient de CsCl, comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). L'ADN plasmidique est ensuite précipité par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est repris dans 0.5 à 1 ml de TE.

2.2. Préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli* en petites quantités :

Cet exemple illustre comment les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez E.coli.

Cette préparation est réalisée à partir de 1.5 ml de culture en milieu LB contenant 150 µg/ml d'ampicilline. La procédure est celle décrite par Birnboim et 5 Doly (1979).

EXEMPLE 3 : Construction de la banque d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 chez E.coli.

Cet exemple illustre comment une banque d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 est réalisée chez E.coli.

10 **3.1. Préparation des fragments d'ADN génomique :**

Cet exemple illustre comment des fragments d'ADN génomique de haut poids moléculaire peuvent être préparés.

L'ADN total de la souche SP92, préparé comme décrit dans l'exemple 1, est digéré partiellement par Sau3A (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 15 USA) dans le tampon préconisé par le fournisseur : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA. La quantité d'enzyme utilisée pour obtenir des fragments d'ADN de haut poids moléculaire, a été déterminée empiriquement. Environ 0.025 unités d'enzyme sont utilisées pour digérer 1 µg d'ADN total pendant 20 mn à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 15 mn à 65°C et 20 l'enzyme éliminée par l'addition d'un volume égal de phénol-chloroforme. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN total partiellement digéré est précipité par ajout d'acétate de sodium 0.3 M final et 2.5 volumes d'éthanol.

Environ 100 µg d'ADN total sont ainsi digérés, puis les fragments d'ADN de taille comprise entre 30 et 50 kb sont isolés par gradient de sucrose 10-40 %. Leur 25 taille est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,4 %.

3.2. Préparation du cosmid pHC79 :

Cet exemple illustre comment le cosmid pHC79 est préparé à partir d'E. coli.

Le cosmid pHC79 (Hohn, B. and Collins, 1980) comprend une partie de pBR322 (Bolivar, F. et al., 1977), la région cro-cII de λ et la région contenant la 30 séquence cos de Charon 4A (Blattner, F.R. et al., 1977).

- L'extraction du cosmide a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1., à partir d'une souche d'E.coli TG1 (K12, Δ (lac-pro) supE thi hsd DS F traD36 proA⁺B⁺ lacIq LacZ Δ M15, Gibson, 1984).

5 500 ng de cosmide pHC79 ont été digérés par BamHI (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) dans 20 μ l de tampon 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH7.9), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercptoéthanol, 100 μ g/ml BSA.

3.3. Ligation des fragments d'ADN et du cosmide :

10 Cet exemple illustre comment les fragments du génome de S.pristinaespiralis SP92, issus d'une digestion Sau3A, peuvent être ligaturés avec le vecteur pHC79 linéarisé par BamHI.

15 Environ 150 ng de cosmide linéarisé comme décrit plus haut ont été précipités à l'éthanol avec 350 ng de fragments d'ADN total de S.pristinaespiralis SP92 préparés comme décrit à l'exemple 3.2. Le culot a été repris dans 10 μ l de tampon de ligation : 50 mM Tris-HCl pH7.8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml de BSA et 0.5 μ l de T4 DNA Ligase à 400 000 unités par ml (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) ont été ajoutés. L'incubation a été réalisée durant une nuit à 15°C.

3.4. Réalisation de l'encapsidation *in vitro*:

20 Cet exemple illustre comment les cosmides construits en 3.3 sont encapsidés *in vitro*.

L'encapsidation des cosmides hybrides après ligation a été réalisée à partir du kit Gigapack II Gold, développé par Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA).

25 2x4 μ l de mélange de ligation, soit 2x70 ng de cosmides hybrides ont été encapsidés *in vitro* selon la procédure décrite par le fournisseur.

3.5. Transfection des souches d'E.coli DH1 et HB101 :

Cet exemple illustre comment les cosmides sont introduits chez E.coli.

Deux transfctions en parallèle ont été réalisées avec les souches d' E.coli DH1 (F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44L⁻, Low 1968) et HB101 (F⁻ 30 supE44 hsdS20(rB⁻mB⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1, Boyer et Roulland-Dussoix 1969).

Les cellules ont été préparées selon le protocole suivant : une préculture de 100 ml est réalisée en milieu LB complémenté par 0.2 % Maltose et 10 mM MgSO₄, pendant 4 à 5 heures jusqu'à ce que la DO600 atteigne la valeur de 0.8. La culture est alors centrifugée et le culot repris dans 40 ml de MgSO₄ 10 mM et dilué jusqu'à 5 DO600=0.5, dans la même solution. 200 µl de la suspension cellulaire ainsi préparée sont mélangés à 100 µl de mélange d'encapsidation. Après 20 mn de contact à 37°C, 1 ml de LB est ajouté et l'ensemble est incubé 1 hr à 37°C. Les transfectants sont ensuite sélectionnés sur milieu LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le nombre de transfectants obtenus est d'environ 10⁴ par µg de cosmid recombinant.

10 **3.6. Stockage des banques d'ADN génomique de *S.pristinaespiralis* SP92 :**

Cet exemple illustre comment les banques d'ADN génomique de *S.pristinaespiralis* SP92 sont conservées.

15 Après vérification de la taille moyenne des fragments insérés dans le cosmid pHC79, environ 1500 colonies issues de chacune des transfections réalisées avec les souches HB101 et DH1 sont repiquées dans des plaques de micro-titration à 96 trous contenant 200 µl de milieu Hogness (milieu LB complémenté avec 8.8 % glycérol, 3 mM sodium acétate, 55 mM K₂HPO₄, 26 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, ampicilline 150 µg/ml). Ces plaques sont incubées une nuit à 37°C puis stockées à -80°C.

20 **EXEMPLE 4 : Préparation des membranes d'hybridation à partir des banques génomiques de *S.pristinaespiralis* SP92 :**

Cet exemple illustre comment l'ADN des colonies constituant les banques génomiques de *S.pristinaespiralis* SP92 est transféré sur une membrane d'hybridation.

25 Ces membranes d'hybridation ont été réalisées en double pour chacune des 2 banques, selon le protocole suivant :

30 Les 15 plaques de micro-titration de chaque banque sont répliquées à l'aide d'une brosse à clous sur milieu LB agar contenant 150 µg d'ampicilline par ml. Après une nuit de croissance à 37°C, le transfert des colonies est effectué sur membrane Biohylon Z⁺ (Biopropé System) selon le protocole suivant : la membrane découpée à la taille adéquate est laissée au contact des colonies pendant 1 mn. Puis une dénaturation est effectuée par imbibition de la membrane avec une solution de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M pendant 5 mn, suivie d'une neutralisation par imbibition de la

membrane dans une solution d'acétate de sodium 3 M pendant 5 mn. L'ADN est fixé sur la membrane par exposition sous une lampe UV pendant 5 mn.

EXAMPLE 5 : Isolement de cosmides portant les gènes codant pour des protéines purifiées impliquées dans la biosynthèse des Streptogramines :

5 Cet exemple décrit comment, à partir d'une protéine purifiée intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines, dont la séquence NH₂-terminale, ou une séquence interne ont été établies, il est possible d'isoler à partir des banques génomiques précédemment réalisées, un cosmid portant le gène de structure de cette même protéine.

10 **5.1. Isolement du cosmid pIBV1 portant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine II A synthase.**

5.1.1. Identification et purification d'une des protéines impliquées dans l'étape finale de la synthèse des Pristinamycines II : la Pristinamycine II A synthase.

15 Comme il a été indiqué dans l'introduction, la dernière étape de synthèse de la Pristinamycine II A correspond à une oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline en déhydroproline. La protéine responsable de cette activité a été purifiée jusqu'à homogénéité comme l'illustre cet exemple.

5.1.1.A. Dosage de l'activité Pristinamycine II A synthase

20 Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine II A qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de la Pristinamycine II A synthase qui catalyse la conversion de la Pristinamycine II B en Pristinamycine II A par oxydation du résidu D-proline de la Pristinamycine II B en résidu 2-3 déhydroproline (figure 6) en présence d'oxygène moléculaire et de FMNH₂. Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0,005 unités) 25 sont incubées 1 h à 27°C dans un volume total de 500 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant NADH (500 µM), FMN (5 µM), Pristinamycine II B (20 µM) et 0,02 unités de FMN réductase (Boehringer Mannheim).

30 La Pristinamycine II A formée est dosée par CLHP après l'arrêt de l'incubation par ajout de 500 µl d'acide chlorhydrique 0,1 N et 500 µl d'acetonitrile, et une centrifugation de l'échantillon pendant 5 minutes à 5 000 g. 150 µl du surnageant de

centrifugation sont injectés sur une colonne Nucléosil 5-C8 de 15 cm éluée par un mélange de 34 % CH₃CN et 66 % tampon phosphate 0,1 M pH 2,9. Les Pristinamycines IIA et IIB sont détectées grâce à leur absorbance UV à 206 nm.

5 L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour synthétiser 1 µmole de Pristinamycine IIA par heure dans les conditions décrites.

5.1.1.B. Purification de la Pristinamycine IIA synthase de S. pristinaespiralis SP92.

10 Cette expérience illustre comment une enzyme de S. pristinaespiralis SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.1.1.A la purification de la Pristinamycine IIA synthase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler et conserver les fractions actives à -30°C entre chaque étape si nécessaire.

15 150 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de S. pristinaespiralis SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 450 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant 5 mM de DTT et 0,2 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 45 minutes à 27°C puis centrifugée à 20 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction protéique précipitant entre 40 et 55 % de saturation est déssalée sur une colonne de Sephadex G25 Fine puis injectée (100 mg par injection) dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM sur une colonne MonoQ HR 10/10. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.1.1.A) sont regroupées et concentrées à 20 ml sur Centriprep 10. Après dilution par un volume de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM contenant 2 M de sulfate d'ammonium, les protéines sont chromatographiées (22,5 mg par injection) sur une colonne Phenyl Superose HR 30 10/10 avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,0 M à 0 M). Les meilleures fractions contenant l'activité recherchée sont rassemblées, reconcentrées à 1 ml sur Centriprep 10, puis appliquées (200 µl par injection) sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 77 000. La fraction contenant l'activité est injectée sur une colonne MonoQ

HR 5/5 dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5M).

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS, deux sous unités de poids moléculaire estimé à 35 000 et 50 000 sont mises en évidence. Elles 5 sont séparées sur colonne Vydac C4 de 25 cm éluée avec un gradient linéaire de 30 à 50 % de CH₃CN dans l'eau à 0,07 % d'acide trifluoroacétique.

Tableau: Purification de la Pristinamycine IIA synthase

tapes de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé. μ mole/h/mg	Rendement	Facteur de purification
Extrait brut	490	1690	0,14	100	1
40-55% sulf.	60	1050	0,19	85	1,4
MonoQ 10/10	95	45	3,0	58	21
Phenylsuperose	8	2,8	12	14	86
BioSil SEC	5	1,3	18	14	130
MonoQ 5/5	10	0,7	23	10	160

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité 10 spécifique des fractions au cours de la purification.

5.1.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir des séquences protéiques :

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminales des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase purifiée comme décrit dans l'exemple 5.1.1B, il est possible de synthétiser des oligonucléotides. Les deux sous-unités de la 15 Pristinamycine IIA synthase sont appelées SnaA et SnaB et correspondent aux polypeptides de poids moléculaire de 50000 et 35000 respectivement tel que cela est décrit à l'exemple 5.1.1.B

Les séquences NH₂-terminales des protéines SnaA et SnaB, correspondant aux sous unitées de la Pristinamycine IIA-synthase, ont été réalisées par micro-séquençage. Ceci est fait par la technique de dégradation d'Edman, en utilisant un séquenceur automatisé (Applied Biosystems modèle 407A) couplé à un appareil CLHP pour l'identification des dérivés phénylthiohydantoïnes. Une trentaine de résidus ont été déterminés pour chacune d'entre elles.

Protéine SnaA : (Cf résidus 2 à 29 sur SEQ ID n° 3)

T A P(R)(R,W)R I T L A G I I D G P G G H V A A(W)R H P (A) T

Protéine SnaB : (Cf résidus 2 à 31 sur SEQ ID n° 5)

T A P I L V A T L D T R G P A A T L G T I T(R)A V(R)A A E A

5 Par ailleurs des séquences internes à ces deux polypeptides ont été déterminées après digestions trypsiques de SnaA et SnaB et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18. Les séquences internes suivantes ont été trouvées:

Protéine SnaA : (Cf résidus 365 à 384 sur SEQ ID n° 3)

G A D G F N I D F P Y L P G S A D D F V

Protéine SnaB : (Cf résidus 122 à 136 sur SEQ ID n° 5)

G L(-)D S F D D D A F V H D R

5 A partir des régions soulignées dans chacune des séquences des fragments internes aux protéines SnaA et SnaB et, en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés par un synthétiseur automatisé Biosearch 8600. Ils ont ensuite été purifiés par la technique déjà décrite (Sawadogo 10 M. et Von Dyke M. W., 1991). Les gènes snaA et snaB désignent les gènes de structure des protéines SnaA et SnaB respectivement.

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaA :
ATC GAC TTC CCC TAC CTC CCC GG

15 T T G T G G
A
T

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaB :

20 TTC GAC GAT GAT GCA TTC GTC CAT GAC
C C T G C
C
G

5.1.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation avec les banques d'ADN génomique de la souche SP92:

25 Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S.pristinaespiralis SP92 a été transféré.

30 Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, d'un groupe phosphate marqué au $\gamma^{32}P$, par la T4 polynucléotide kinase. Ce marquage est réalisé comme indiqué dans Maniatis et al. (1989). Après le marquage, les oligonucléotides sont utilisés sans purification.

Environ 2 X 500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au $\gamma^{32}P$ et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque est réalisée selon un protocole dérivé de ceux développés par Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984) et Hames, B.D. and Higgins, S.J. (1985) : les 15 membranes sont préhybridées pendant 3 hrs à 50°C dans 40 ml d'une solution contenant : DenhardtX5 (DenhardtX100 : 2 % (p/v) Ficoll, 2 % (p/v) polyvinyl-pyrrolidone, 2 % (p/v) BSA), SSCX5 (SSCx20 : NaCl 3 M, citrate de sodium 0.3 M), NaPO4 pH6.5 50 mM, SDS 0.1 %, ADN de sperme de saumon 250 µg/ml.

L'hybridation est ensuite réalisée pendant une nuit à 50°C, dans 20 ml de la même solution auxquels sont ajoutés les 500 ng d'oligonucléotides marqués.

10 Les filtres sont ensuite lavés dans une solution de SSCX6 et SDS 0.5 %, 2 fois 30 mn à température ambiante puis de façon empirique à des températures graduellement plus élevées (50 à 65 °C). La température de ces derniers lavages est progressivement augmentée après des expositions autoradiographiques successives afin de déterminer la spécificité des clones hybridants avec les mélanges 15 d'oligonucléotides.

5.1.4. Isolement du cosmid pIBV1 et détermination des régions contenant les gènes snaA et snaB :

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmid, tel que construit à l'exemple 3, contenant des gènes de biosynthèse des Pristinamycines.

20 Le cosmid pIBV1 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche HB101, ayant hybridé simultanément avec les deux mélanges d'oligonucléotides préparés dans l'exemple 5.1.2.

25 Ce cosmid a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 36 kb. Une cartographie (figure 4) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, selon les protocoles du fournisseur (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA).

30 Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV1 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région de ce cosmid contenant les gènes snaA et snaB.

Les Southerns ont été réalisés comme décrit dans Maniatis et al. (1989). Après séparation des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %, l'ADN est transféré sur membrane Biohylon Z⁺ (Biopropé System). L'hybridation de

l'ADN ainsi transféré sur les membranes avec les mélanges d'oligonucléotides a été réalisée comme décrit dans l'exemple 5.1.3.

Ces Southerns ont permis de montrer que le cosmide pIBV1 possédait un fragment BamHI de 6 kb contenant les séquences homologues aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.1.2.

5.2. Isolement du cosmide pIBV2 contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (snbA).

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins un gène de biosynthèse des Pristinamycines I.

5.2.1. Identification et purification de la protéine impliquée dans l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique.

Cet exemple illustre comment la protéine responsable de l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique peut-être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de S.pristinaespiralis SP92.

5.2.1.A. Dosage de l'activité acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase

Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase qui catalyse la formation de l'adenylate de l'acide 3-hydroxypicolinique (figure 7) à partir de cet acide libre et de l'ATP en présence de MgCl₂.

Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0,020 unités) sont incubées pendant 15 min à 27°C dans un volume total de 250 µl de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, en présence d'acide 3-hydroxypicolinique (1mM), ATP (2mM), MgCl₂ (5mM) et tetrasodium pyrophosphate marqué avec l'isotope 32 radioactif de l'atome de phosphore (200 µM).

La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml d'une suspension de charbon activé à 10 g/l dans un mélange de 75 % de tetrasodium pyrophosphate 0,1 M et 25 % d'acide perchlorique à 14 %. Après agitation le charbon est recueilli et lavé par deux fois 1 ml du mélange pyrophosphate-acide perchlorique. Les molécules organiques

radioactives sont alors éluées par trois fois 1 ml d'un mélange de 50 % de méthanol et 50 % d'ammoniaque N, dans une fiole de comptage contenant 12 ml d'eau. La radioactivité est mesurée par effet Cerenkov avec un compteur à scintillation (Minaxi TriCarb 4000 PACKARD).

5 L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour incorporer 1 μ mole de pyrophosphate dans l'ATP en 1 heure dans les conditions décrites ci-dessus.

5.2.1.B. Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de S. pristinaespiralis SP92.

10 Cette expérience illustre comment une enzyme de S. pristinaespiralis SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.2.1.A, la purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler à -70°C les fractions actives et de les conserver à -30°C 15 entre chaque étape si nécessaire.

234 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de S. pristinaespiralis SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 234 ml de tampon pH 8 tris-HCl 100 mM contenant 4 mM DTE, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v 20 glycérol et 0,6 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 30 minutes à 27°C puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est injecté dans le tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol sur une colonne (80 ml) de Q-Sepharose Fast Flow. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 25 à 0,4 M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.2.1.A) sont regroupées et diluées par un volume de tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol contenant 2 M de sulfate d'ammonium. Les protéines sont alors chromatographiées 30 sur une colonne (50 ml) de Phenyl Sepharose avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,0 M à 0 M) dans le tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol. Après ajout de 4 mM DTE, les fractions actives sont rassemblées, reconcentrées à 5 ml sur Centriprep 10, puis appliquées sur une colonne (100 ml) de Superose 12 prep grade. Les fractions contenant l'activité recherchée sont regroupées et injectées dans le tampon pH 8

tris-HCl 100 mM, DTE 4mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol (environ 6 mg par injection) sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,4 M). Les fractions actives sont regroupées, concentrées à 1 ml sur Centricon 10, diluées par 3 volumes de tampon pH 6,8

5 bis-tris-propane 50 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol, puis injectées (2 mg par injection) dans ce dernier tampon sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluée avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,3 M). Les meilleures fractions contenant la ligase recherchée sont regroupées, puis appliquées dans le

10 tampon pH 6,8 phosphate de sodium 20 mM, sulfate de sodium 50 mM sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 60 000.

La protéine possédant l'activité d'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique est désignée par la suite SnbA.

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS son poids moléculaire est estimé à environ 67 000.

Tableau: Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase

Etapes de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé. $\mu\text{mole/h/mg}^a$	Rendement	Facteur de purification
Extrait brut	246	2050	(0,06)		
Q-Sepharose	40	188	0,47	100	1
Phenylsepha.	70	35	2,21	88	4,7
Superose 12	16	17	2,03	39	4,3
MonoQ pH 8	4,5	9,0	2,09	21	4,5
MonoQ pH 6,8	1	2,0	2,9	6,6	6,2
Bio-Sil 250	2,5	0,23	12,4	3,2	26

^a L'activité dans l'extrait brut ne peut pas être mesurée précisément à cause d'échanges entre le pyrophosphate et l'ATP non spécifiques de l'acide 20 3-hydroxypicolinique.

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.2.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique:

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminale et interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de synthétiser des oligonucléotides.

La séquence NH₂-terminale de la protéine SnbA a été réalisée par micro-
5 séquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. Une vingtaine de résidus ont été ainsi identifiés.

Une séquence interne à la protéine SnbA, d'environ 20 acides aminés, a également été identifiée, après hydrolyse trypsique et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18.

10 Séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :
(Cf résidus 1 à 21 sur SEQ ID n° 9)

MLDG SVPWPEDVA AKYRAAGY

Séquence interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase:
(Cf.résidus 448 à 467 sur SEO ID n° 9)

15 VSA (-) EVEGHLGAHPDVQOAA

A partir des régions soulignées dans chacune des séquences et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

5' GTC CCC TGG CCC GAG GAC GTC GCC GCC AAG TAC 3'
G G G G G G G

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de la
25 protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

5' GAG GTC GAG GGC CAC CTC GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG CAG GC 3'

5.2.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation des banques d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 :

5 Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S.pristinaespiralis a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, d'un groupe phosphate marqué au $\gamma^{32}\text{P}$, par la T4 polynucléotide kinase, comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

10 Environ 2X500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au $\gamma^{32}\text{P}$ et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque a été réalisée comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

15 5.2.4. Isolement du cosmid pIBV2 et détermination de la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmid, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

20 Le cosmid pIBV2 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche d'E.coli DH1, ayant hybridé avec les deux mélanges d'oligonucléotides simultanément.

25 Ce cosmid a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 47 kb. Une cartographie (figure 5) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, comme indiqué dans l'exemple 5.1.4.

Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV2 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

30 Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmid pIBV2 possédait un fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, contenant la séquence homologue aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.2.2.

EXAMPLE 6 : Sous clonage des fragments d'ADN clonés dans des cosmides tels que préparés dans l'exemple 3 et contenant les gènes d'intérêt.

Cet exemple illustre comment à partir des cosmides construits comme décrit à l'exemple 3 et contenant des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II ou des 5 Pristinamycines I, il est possible de sous cloner des fragments d'ADN contenant ces gènes.

Ces sous clonages ont été effectués afin de pouvoir réaliser ultérieurement la séquence nucléique des gènes identifiés ainsi que les différentes constructions présentées dans les exemples suivants.

10 **6. 1. Isolement du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.**

Cet exemple décrit comment à partir du cosmid pIBV2, contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant ce gène.

15 Environ 10 µg du cosmid pIBV2 ont été coupés successivement par les enzymes de restriction BglII et EcoRI (New England Biolabs) dans les conditions préconisées par le fournisseur. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-EcoRI de 5.5 kb a été isolé par électroélution comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989).

20 Environ 100 ng de pUC19 (Viera et Messing 1982) coupés par BamHI et EcoRI ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BglII-EcoRI de 5,5 kb, dans les conditions décrites dans l'exemple 3.3.

Après transformation de la souche TG1 et sélection des transformants sur milieu 25 LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline et 20 µg/ml de X-gal, selon la technique décrite par Maniatis *et al.* (1989), un clone portant le fragment souhaité a été isolé. Le 30 plasmide recombinant a été nommé pVRC402. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 8(A). Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.2, que le fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, contient le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de S. pristinaespiralis SP92. Le plasmide pVRC402 contient donc le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de S. pristinaespiralis SP92.

6. 2. Isolement d'un fragment BglII-BglII de 4.6 kb à partir du cosmid pIBV2.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, dans le but d'identifier dans les régions adjacentes au gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, la présence d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I.

5 Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.
 Environ 10 µg du cosmide pIBV2 ont été coupés par BglII. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-BglII de 4.6 kb a été isolé par électroélution.
 Environ 100 ng de pUC19 coupés par BamHI ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BglII-BglII.
 Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1 comme décrit dans l'exemple 6.1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC501. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 8(B).

15 6.3. Isolement du fragment BamHI-BamHI de 6 kb contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV1, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.
 20 Environ 10 µg du cosmide pIBV1 ont été coupés par BamHI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BamHI de 6 kb a été isolé par électroélution.
 Environ 100 ng de pBKS- (Stratagene Cloning Systems, La Jolla Californie) coupés par BamHI, ont été ligaturés avec 200 ng du fragment BamHI de 6 kb.
 25 Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pXL2045. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 9. Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.1, que le fragment BamHI de 6 kb, contient les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92. Le 30 plasmide pXL2045 contient donc les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92.

EXAMPLE 7 : Séquence des fragments d'ADN isolés contenant les gènes de biosynthèse des Pristinamycines de S. pristinaespiralis SP92

Cet exemple illustre le séquençage de fragments d'ADN portant d'une part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines I et d'autre part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines II de la souche *S. pristinaespiralis*.

5 7.1. Séquençage d'un fragment BamHI-XhoI de 5 kb

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant les gènes snaA et snaB de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

Le fragment BamHI-XhoI fait partie du fragment BamHI-BamHI de 6 kb qui a été cloné dans le phasmide pBKS- pour donner le plasmide pXL2045 décrit dans 10 l'exemple 6. Des sous-fragments de cet insert BamHI-XhoI de 5 kb ont ensuite été obtenus par digestion enzymatique puis sous-clonés dans les phages M13mp18 ou M13mp19 (Messing et al., 1981) dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage utilisés sont les suivants : EcoRI, PstI, PstI, NruI, EcoRI, NruI, NotI, SalI, SstI, XhoI, SalI et XhoI et sont représentés sur la figure 9.

15 Ces différents inserts ont été séquencés par la méthode de réaction de terminaison de chaîne en utilisant comme amorce de synthèse le primer universel (Maniatis et al., 1989) ou des oligonucléotides synthétisés (comme il est décrit dans l'exemple 5), et complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer.

20 Le recouvrement entre ces différents inserts a permis d'établir la séquence nucléotidique totale sur les deux brins du fragment BamHI-XhoI qui comprend 5392 pb (SEQ ID n° 1).

7. 2. Séquençage d'une région de 1870 bp du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment 25 contenant le gène snbA de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

La région de 1870 pb séquencée fait partie du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC402 décrit dans l'exemple 6 (figure 8(A)). Des sous-fragments de l'insert EcoRI-BglII de 5.5 kb ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages M13mp18 30 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont HindIII, PstI et HindIII et sont représentés sur la figure 8(A).

Le recouvrement entre ces fragments a permis d'établir la séquence totale de la région Sau3A-Sau3A qui comprend 1870 pb (SEQ ID n° 8).

7.3. Séquence d'une région de 1830 pb dans le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb

5 Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment adjacent à celui qui contient le gène snbA de S. pristinaespiralis SP92 peut être obtenue.

10 Cette séquence a été réalisée par sous-clonage des fragments BamHI-PstI de 1 kb et PstI-EcoRI de 2,1 kb (figure 8(B)) à partir du pVRC501 (Exemple 6) dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Le site PstI a été traversé par sous-clonage d'un fragment Sau3A-Sau3A de 423 pb chevauchant ce site, puis séquençage. La séquence de 1830 pb ainsi obtenue est représentée sur la (SEQ ID n° 10).

EXAMPLE 8: Analyse des séquences nucléotidiques par détermination des phases ouvertes

15 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes dans les séquences nucléotidiques définies à l'exemple 7, et d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des Pristinamycines II de S. pristinaespiralis SP92 ainsi que les polypeptides codés par ces gènes.

8.1. Fragment BamHI-XhoI de 5 kb (pXL2045).

20 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

25 Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb en utilisant le fait que l'ADN des Streptomyces présente un haut pourcentage en bases G et C ainsi qu'un fort biais dans l'usage des codons qui composent les phases codantes (Bibb et al. 1984). La méthode de Staden et McLachlan (1982) permet de calculer la probabilité des phases codantes en fonction de l'usage des codons de gènes de Streptomyces déjà séquencés et rassemblés dans un fichier contenant 19673 codons obtenu à partir du serveur informatique 30 BISANCE (Dessen et al. 1990).

Cette méthode a permis de caractériser au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb, quatre phases ouvertes de lecture fortement probables qui sont représentées dans le tableau suivant. Elles sont nommées phases 1 à 4 d'après leur position à partir du site BamHI. Pour chacune, on a indiqué leur longueur en bases, leur position au sein du fragment (le site BamHI étant situé à la position 1) ainsi que le poids moléculaire en kDa de la protéine correspondante. Les phases 1, 3 et 4 sont codées par le même brin et la phase 2 par le brin complémentaire (figure 9).

Numéro de la phase et nom du gène	Position	nombre de nucléotides	nombre d'acides aminés	PM en kDa de la protéine codée
1 (<u>snaA</u>)	48-1313	1266	422	46.5
2	2530-1328 (inv)	1203	401	-
3 (<u>snaB</u>)	2692-3522	831	277	29
4 (<u>snaC</u>)	3558-4763	1206	402	43

- Les phases 1 et 3 correspondent respectivement aux protéines SnaA (SEQ ID n° 2 et 3) et SnaB (SEQ ID n° 4 et 5) précédemment isolées comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage des gènes est détaillé dans l'exemple 6. En effet les séquences NH₂-terminales des produits des ORFs 1 et 3 sont identiques aux séquences NH₂-terminales trouvées pour les protéines SnaA et SnaB respectivement, à l'exemple 5.1.2, sauf pour la méthionine amino-terminale qui a été excisée. Par ailleurs, les masses moléculaires calculées d'après les séquences sont comparables aux masses moléculaires apparentes des protéines SnaA et SnaB, estimées respectivement en PAGE-SDS comme il est décrit dans l'exemple 5.

- La comparaison du produit de la phase ouverte n°4 avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro fait apparaître une homologie avec différentes S-adenosylmethionine (ou SAM) synthases codées par d'autres organismes. Les pourcentages d'homologie calculés sur la totalité de la séquence à l'aide de l'algorithme de Kanehisa (1984) varient de 51,8 à 55.4 %.

Ces comparaisons de séquence permettent donc de mettre en évidence que le produit de la phase ouverte n°4 est une SAM synthase, impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines II (et peut-être Pristinamycines I). Ce gène a été désigné snaC (SEQ ID n° 6 et 7).

5 La mise en évidence de l'implication d'une SAM synthase dans la biosynthèse des Streptogramines est confirmée par les données biochimiques décrites pour la Virginiamicine M1 (une Streptogramine appartenant au même groupe A que les Pristinamycines II) qui indiquent que le groupement méthyl C-33 provient vraisemblablement d'une alkylation d'un groupement méthylène situé en position C-4
10 du cycle macrolactone avec une molécule de SAM (Kingston *et al.* 1983).

15 - La comparaison de la séquence du produit de la phase ouverte n°2 avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro, fait apparaître qu'une partie interne de cette protéine est homologue à 36% avec une partie interne de la première phase ouverte de la séquence d'insertion (IS891) d'Anabaena (Bancroft et Wolk, 1989). Ce résultat suggère que la phase ouverte n°2, désignée orf 401, appartient à une séquence d'insertion, et donc qu'il existe une séquence d'insertion située entre les gènes snaA et snaB.

8. 2. Fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb (pVRC402)

20 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

25 La recherche de phases ouvertes pour le fragment Sau3A-Sau3A a été effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: cette phase s'étend de la position 109 à la position 1858 du fragment Sau3A-Sau3A, ce qui correspond à une phase de 1749 bases codant pour une protéine de 582 acides aminés ayant une masse moléculaire de 61.4 kDa. Cette protéine correspond à la protéine SnbA précédemment purifiée comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage du gène est détaillé dans l'exemple 6. En effet la séquence NH₂-terminale du produit de 30 l'ORF présente sur le fragment Sau3A-Sau3A est identique à la séquence NH₂-terminale trouvée pour la protéine SnbA, à l'exemple 5.2. La masse moléculaire de 61.4 kDa calculée d'après la séquence est comparable à la masse moléculaire apparente de la protéine SnbA, estimée à 67 kDa en PAGE-SDS et à 600 kDa par perméation sur gel comme il est décrit dans l'exemple 5.2.1B.

Le gène snbA code donc pour l'enzyme qui catalyse la formation de l'acyladenylate 3-hydroxypicolinyl-AMP à partir d'une molécule d'acide 3-hydroxypicolinique et d'une molécule d'ATP : l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (SEQ ID n° 8 et 9).

5 8.3. Fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb (pVRC501).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb a été 10 effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: le démarrage probable de cette phase se situe à la position 103 et la fin à la position 1686 de la 15 région de 1830 pb séquencée à partir du fragment BamHI-EcoRI, ce qui correspond à une protéine de 528 acides aminés ayant un poids moléculaire approximatif de 54 kDa.

La comparaison de la séquence de cette protéine avec les séquences contenues dans la banque Genepro fait apparaître qu'elle est homologue à des protéines ayant une fonction de transport pour différents métabolites, notamment pour la tétracycline chez différents microorganismes (Khan et Novick, 1983; Hoshino et al., 1985), 20 l'actinorhodine (Fernandez-Moreno et al., 1991) et la méthylénomycine (Neal et Chater, 1987b) chez S. coelicolor.

Ces données indiquent que le produit de la phase ouverte contenue dans le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb est une protéine de transport permettant d'exporter les Pristinamycines I (et éventuellement Pristinamycines II) à l'extérieur de la cellule. 25 Cette protéine a été désignée SnbR et le gène correspondant snbR (SEQ ID n° 10 et 11).

L'analyse du profil d'hydrophobité de la protéine SnbR par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) corrobore sa localisation membranaire et donc sa fonction de transport.

30 L'étude des fragments d'ADN de la souche S. pristinaespiralis SP92, portés par les cosmides pIBV1 et pIBV2, a mis en évidence la présence de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I. Les gènes snaA, snaB et snaC codent pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse

des Pristinamycines II, la Pristinamycine IIA-synthase et une probable SAM synthase et sont groupés physiquement sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmid pIBV1. De même les gènes snbA et snbR qui codent pour des protéines intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines I, l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase 5 et une protéine probablement responsable du transport des Pristinamycines I, sont groupés sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmid pIBV2. Ces résultats confirment l'hypothèse du groupement des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et également des gènes de biosynthèse des Pristinamycines I et offrent la possibilité de cloner les autres gènes impliqués dans ces biosynthèses, par marche sur le 10 chromosome, en amont et en aval des régions étudiées.

De plus, il est possible par hybridation de l'ADN total des différentes souches productrices de Streptogramines (cf tableau 1) avec les gènes snaA, snaB, snaC, snbA, snbR, ou avec les gènes identifiés par marche sur le chromosome, ou avec des fragments de ceux-ci, d'isoler les gènes correspondants aux mêmes fonctions dans les 15 autres microorganismes producteurs de Streptogramines. Ceci permet par la même démarche que celle envisagée pour les Pristinamycines, d'isoler l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse des différentes Streptogramines.

EXAMPLE 9 : Etude génétique de fragments d'ADN par disruption de gènes.

20 Cet exemple illustre comment il est possible de mettre en évidence l'implication de gènes dans la biosynthèse des Streptogramines en construisant des souches dérivées d'une souche productrice, mutées au niveau de ces gènes par disruption et en analysant le phénotype de tels mutants. Cet exemple montre de plus comment obtenir des souches ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants A et B des 25 Streptogramines.

9.1 Construction d'un mutant de *S.pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène snaA.

30 Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène snaA, de construire une souche de S.pristinaespiralis SP92 qui ne produit plus de Pristinamycine IIA et qui produit par contre de la Pristinamycine IIB.

Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonctionnalité de la protéine SnaA et de fournir un intermédiaire de production de la Pristinamycine II, pouvant par la suite être modifié.

— Sa construction a été réalisée à l'aide d'un vecteur suicide, capable de se répliquer chez E.coli seulement, mais portant un marqueur de résistance s'exprimant chez Streptomyces. Ce vecteur, pDH5, a été développé par Hillemann et al. (1991).

9.1.1 Construction du plasmide pVRC505 :

5 Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez S.pristinaespiralis SP92 et qui peut être utilisé pour disrupter par simple recombinaison homologue le gène snaA.

Le plasmide pVRC505 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène snaA à partir du plasmide pXL2045 décrit dans l'exemple
10 6.3.

15 Le fragment BamHI de 6 kb, cloné dans le pXL2045 (figure 9), a été coupé par les enzymes de restriction EcoRI et PstI. Après séparation des fragments ainsi générés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, un fragment de 0.7 kb, contenant l'extrémité 5' du gène snaA, a été isolé et purifié par Geneclean (Bio101, La Jolla, Californie).

20 100 ng de vecteur pDH5 linéarisé par une double digestion EcoRI, PstI, ont été ligués avec 100 ng du fragment de 0.7 kb, comme décrit dans l'exemple 3.3. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC505. Le plasmide pVRC505 a été préparé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 10.

9.1.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène snaA par recombinaison homologue.

25 Cet exemple illustre comment le mutant de S.pristinaespiralis SP92, disrupté dans le gène snaA, a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC505.

La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit dans D. Hopwood et al. (1985).

30 La souche SP92 a été cultivée en milieu YEME, 34% de sucre, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25 % pendant 40 hrs à 30°C. Le mycélium a été protoplastisé en présence

de lysozyme et 5x1 µg de pVRC505 ont été utilisés pour la transformation (par la méthode utilisant le PEG) des protoplastes. Après une nuit de régénération des protoplastes sur milieu R2YE (D. Hopwood *et al.* 1985), les recombinants ont été sélectionnés par également de 3 ml de milieu SNA (D. Hopwood *et al.* 1985) 5 contenant 2.6 mg/ml de thiostrepton.

Sur les 5 transformations réalisées, 3 clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants inférieur à 1 par mg d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène snaA porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 0.7 kb du 10 plasmide suicide pVRC505. La faible taille du fragment inséré dans pVRC505, 0.7 kb, explique le faible taux de recombinaison.

Les spores des recombinants ont été isolées par également et croissance sur milieu R2YE supplémenté par 400 µg/ml de thiostrepton, et réétagées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées.

15 Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC505, différents Southern de l'ADN total de plusieurs clones recombinants digérés par les enzymes de restriction appropriées, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment de 0.7 kb, utilisés successivement comme sondes après marquage par random priming (Random Primed DNA labeling kit, Boehringer Mannheim, France) 20 avec du dCTP α P³², comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). Les résultats d'hybridation montrent l'apparition, dans le génome des clones recombinants, d'une bande EcoRI-PstI supplémentaire, de la taille du vecteur pDH5 et hybridant avec celui-ci ainsi que d'une bande supplémentaire EcoRI-EcoRI, hybridant à la fois avec les 2 sondes. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC505. Ce mutant correspond 25 bien à l'intégration par simple recombinaison homologue du plasmide pVRC505 dans le gène snaA.

9.1.3 Production de Pristinamycines par le mutant SP92::pVRC505.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de *S.pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène snaA par l'intégration du plasmide pVRC505, ne produit plus de Pristinamycine IIA, tout en continuant à produire de la Pristinamycine IIB.

Le mutant SP92::pVRC505, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée

comme suit : 0.5 ml d'une suspension de spores des souches citées sont ajoutés en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl , 0.2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1.25 g/l de 5 CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6.9 par de la soude avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 hrs à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 tr/mn. 2.5 ml de la culture précédente âgée de 44 hrs sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de 10 production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7.5 g/l d'amidon, 22.5 g/l de glucose, 3.5 g/l de levure fourragère, 0.5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6 par de l'acide chlorhydrique avant l'introduction du 15 carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 24, 28 et 32 hrs à 27°C. A chaque temps, 10 g de moût sont pesés dans un erlen lisse, auxquels sont ajoutés 20 ml de phase mobile composée par 62.5 % d'acétonitrile et 37.5 % d'une solution de 0.1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH3 par H_3PO_4). Après agitation sur un agitateur (325 rpm) pendant 20 mn à température ambiante, le tout est filtré sur filtre de papier et les Pristinamycines sont dosées par CLHP comme décrit à l'exemple 5.1.1A.

Les résultats ont montré que, dans les conditions de fermentation réalisées, le 20 mutant SP92::pVRC505 a produit une quantité de Pristinamycine I équivalente à celle du témoin SP92, ceci pour les 3 temps testés. En revanche, alors que le témoin a produit à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, environ 70 % de Pristinamycine IIA et 30 % de Pristinamycine IIB, le mutant SP92 :: pVRC505 a produit pour ces mêmes 25 temps, 100 % de Pristinamycine IIB, en quantité équivalente à la somme des Pristinamycine IIA + Pristinamycine IIB produites par la souche SP92. Le mutant est donc bien bloqué dans une étape de biosynthèse de la Pristinamycine II qui correspond à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ce mutant accumule donc la Pristinamycine IIB. Ceci montre bien l'implication fonctionnelle de SnaA dans la conversion Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA.

30 Cet exemple montre qu'il est possible, à partir des gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines. Ceci a été montré pour les Pristinamycines II mais les mêmes résultats peuvent être obtenus pour les Pristinamycines I et par extension, pour les différents composants des Streptogramines. Des souches produisant différents intermédiaires peuvent être

ainsi obtenues. Ces souches peuvent être utilisées pour produire des molécules nouvelles, par modification(s) chimique, biochimique, enzymatique, etc desdits intermédiaires. Un blocage dans une étape précoce de la voie de biosynthèse de l'un ou l'autre des composants des Streptogramines peut également conduire à des souches 5 mutées ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants.

EXEMPLE 10 : Complémentation d'un mutant non producteur de la souche SP92.

10 Cet exemple montre comment il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Cette expression a été plus particulièrement réalisée pour les gènes snaA et snaB portés par le cosmid pIBV1, dans une souche mutante dérivée de SP92 : SP120. Ce mutant ne produit pas de Pristinamycine II A. Il accumule le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine II : Pristinamycine II B.

10.1 Clonage des gènes snaA et snaB dans le vecteur navette pIJ903.

15 Cet exemple illustre comment un sous-fragment du cosmid pIBV1, contenant les gènes snaA et snaB, a été cloné dans un vecteur capable de se répliquer à la fois chez E. coli et chez Streptomyces.

20 Le vecteur pIJ903 (Lydiate D. J. et al., 1985) est un vecteur navette à faible nombre de copies (1 à 3 par cellule), capable de se répliquer à la fois chez E.coli grâce à son origine de réplication de pBR322 et chez Streptomyces grâce à son origine de réplication de SCP2*. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection dans E.coli et le gène de résistance au thiostrepton permet la sélection dans Streptomyces.

25 Le cosmid pIBV1 a été digéré par l'enzyme de restriction SstI. Un large fragment d'ADN de 7.6 kb portant les gènes snaA et snaB a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroéluié. 500 ng de ce fragment ont été ligaturés avec 100 ng du vecteur pUC1813 (Kay et McPherson, 1987) linéarisé par SstI. Après transformation de la souche E.coli DH5 α (supE44 ΔlacU169 (f80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1; Hanahan, 1983) et 30 sélection des transformants sur LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline et 20 μ g/ml de X-gal, un clone portant le fragment de 7.6 kb a été isolé. Le plasmide a été

nommé pVRC506. Une préparation de ce plasmide recombinant a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1.

Le clonage dans le vecteur pIJ903 a été réalisé au site HindIII. Le plasmide pVRC506 a été coupé par HindIII et le fragment de 7.6 kb portant les gènes snaA et 5 snaB a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroéluié. 500 ng de ce fragment ont été ligaturés avec 500 ng du vecteur pIJ903 linéarisé par HindIII. Après transformation de la souche E.coli DH5 α et sélection des transformants sur LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline, un clone portant le fragment de 7.6 kb a été isolé. Le plasmide a été nommé pVRC507. Une préparation de ce plasmide 10 recombinant a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa cartographie est présentée figure 11.

10.2 : Expression des gène snaA et snaB dans le mutant SP120

Cet exemple illustre comment il est possible d'exprimer les protéines SnaA et SnaB chez S.pristinaespiralis SP92, par introduction dans cette souche, d'un plasmide 15 portant les gènes de structure correspondants.

L'expression des gènes snaA et snaB a été réalisée après transformation de la souche mutante SP120 avec 500 ng de plasmide pVRC507. La transformation des protoplastes de SP120 et la sélection des transformants au thiostrepton a été réalisée comme décrit dans l'exemple 9.1.2.

20 De nombreux transformants ont été ainsi obtenus et 3 d'entre eux ont été choisis pour les tests de production en milieu liquide. La souche SP120 portant le plasmide pIJ903 a été choisie comme témoin. Les fermentations ainsi que l'extraction des produits de biosynthèse ont été réalisés comme décrit en l'exemple 9.1.3.

25 Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, alors que le témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903) a produit à 24, 28 et 32 hrs de fermentation, 100 % de Pristinamycine IIB et 0 % de Pristinamycine IIA, les 3 clones de la souche SP120 transformés par le plasmide pVRC507, ont produit pour ces mêmes temps, environ 85 à 80 % de Pristinamycine IIB et 15 à 20 % de Pristinamycine IIA, dont la somme est équivalente en quantité à la production de 30 Pristinamycine IIB de la souche témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903). Les clones portant pVRC507 ont bien été complémentés pour l'étape de biosynthèse des Pristinamycines II correspondant à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ceci a été confirmé par dosage enzymatique de l'activité Pristinamycine IIA-synthase, comme décrit dans l'exemple 5.1.1.A., pour les

souches SP120 portant pVRC507 et SP120 portant pIJ903. Alors que la souche témoin SP120 portant pIJ903, ne présente aucune activité Pristinamycine IIA-synthase, la souche SP120 portant pVRC507, présente une activité Pristinamycine IIA-synthase.

5 Cet exemple montre qu'il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Streptogramines. Cette expression a été étudiée plus particulièrement pour les gènes codant pour la Pristinamycine IIA-synthase mais les autres gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I et ainsi que ceux impliqués dans la biosynthèse des composants des différentes Streptogramines peuvent être ainsi 10 exprimés. Cette expression peut être réalisée dans des souches mutantes comme c'est le cas dans l'exemple 10, mais également dans des souches productrices afin d'augmenter les niveaux de production des Streptogramines. L'expression peut être modifiée par clonage des gènes dans un vecteur à nombre de copies différent (faible ou élevé) ou dans un vecteur intégratif, par dérégulation de ces gènes, par clonage de 15 ces gènes sous un promoteur homologue ou hétérologue (promoteur fort ou régulé spécifiquement). L'expression des différents gènes de biosynthèse des Streptogramines peut également être réalisée dans des souches hétérologues à partir de vecteurs d'expression adaptés, afin de produire des antibiotiques hybrides.

TABLEAU 1

MICROORGANISMES	ANTIBIOTIQUES
CHAMPIGNONS	
<u>Micromonospora</u> sp.	Vernamycines
STREPTOMYCES	
<u>S. alborectus</u>	Virginiamycines
<u>S. conganensis</u> (ATCC13528)	F1370 A, B
<u>S. diastaticus</u>	Plauracines, Streptogramines
<u>S. graminofasciens</u>	Streptogramines
<u>S. griseus</u> (NRRL2426)	Viridogriséine (Etamycine)
<u>S. griseoviridus</u>	Griseoviridine
<u>S. griseoviridus</u> (FERMP3562)	Néoviridogriséines
<u>S. lavendulae</u>	Etamycines
<u>S. loïensis</u> (ATCC11415)	Vernamycines
<u>S. mitakaensis</u> (ATCC15297)	Mikamycines
<u>S. olivaceus</u> (ATCC12019)	Synergistines (PA114 A, B)
<u>S. ostréogriseus</u> (ATCC27455)	Ostréogrycines
<u>S. pristinaespiralis</u> (ATCC25486)	Pristinamycines
<u>S. virginiae</u> (ATCC13161)	Virginiamycines (Staphylomycines)
ACTINOMYCETES	
<u>A. auranticolor</u> (ATCC31011)	Plauracines
<u>A. azureus</u> (ATCC31157)	Plauracines
<u>A. daghestanicus</u>	Etamycine
<u>A. philippinensis</u>	A-2315 A, B, C
<u>Actinoplanes</u> sp. (ATCC33002)	A15104
<u>Actinoplanes</u> sp.	A17002 A, B, C, F
<u>Actinomadura flava</u>	Madumycines

Abreviations utilisées :

ADN :	acide déoxyribonucléique
AMP :	adénosine 5'-monophosphate
ATP :	adénosine 5'-triphosphate
5 BET :	bromure d'éthidium
BSA :	bovine serum albumine
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
DO :	Densité optique
DTE :	dithioerythritol
10 DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
FMN :	flavine mononucleotide
FMNH ₂ :	flavine mononucleotide reduite
kDa:	kilodalton
15 kb:	kilobase
LB:	Luria broth (milieu de croissance riche pour <u>E. coli</u>)
NAD :	nicotinamide dinucleotide
NADH :	nicotinamide dinucleotide reduit
PAGE :	electrophorese sur gel polyacrylamide
20 pb :	paire de base
PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPi :	pyrophosphate
SAM:	S-adénosylméthionine
SDS :	sodium dodecyl sulfate
25 TE :	tris-EDTA
Tris:	amino-2-hydroxyméthyl-2 propanediol-1,3
U.V.:	rayons ultra-violets
Xgal:	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galactoside
YEME:	yeast extract-malt extract medium (milieu de croissance riche pour <u>Streptomyces</u>)

Bibliographie:

- Anzai H., Murakami T., Imai A., Satoh A., Nagaoka K. et Thompson C. J. (1987) *J. Bacteriol.*, **169** : 3482-3488.
- Bancroft I. et WolK C. P. (1989) *J. Bacteriol.*, **171** : 5949-5954.
- Bibb M. J., Findlay P. R. et Johnson M. W. (1984) *Gene*, **30** : 157-166.
- Birnboim H. C. et Doly J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **7** : 1513-1523.
- Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D.D., Schumm J.W., Sheldon E. L. et Smithies O. (1977) *Science*, **196** : 161-169.
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H. et Falkow S. (1977) *Gene*, **2** : 95-113.
- Boyer H. W. et Roulland-Dussoix D. (1969) *J. Mol. Biol.*, **41** : 459.
- Chater K. F. (1990) *Bio/Technology*, **8** : 115-121.
- Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, **43** : 145-198.
- Cocito C. G. (1983) *In Antibiotics*, **6** : (Ed. F. E. Hahn), 296-332.
- Dessen P. C., Fontrat C., Valencien C. et Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, **6** : 355-356.
- Di Giambattista M., Chinali G. et Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, **24** : 485-507.
- Fernandez-Moreno M. A., Caballero J. L., Hopwood D. A. et Malpartida F. (1991) *Cell*, **66** : 769-780.
- Gibson T. J. (1984) *Ph.D. thesis*, Cambridge University, England.
- Hallam S. E., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1988) *Gene*, **74** : 305-320.
- Hames B. D. et Higgins S. J. (1985) *IRL Press Ltd., Oxford, U. K.*,
- Hanahan D. (1983) *J. Mol. Biol.*, **166** : 557
- Hillemann D., Pülher A. et Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, **19** : 727-731.
- Hohn B. et Collins J. F. (1980) *Gene*, **11** : 291-298.
- Hook J. D. et Vining L. C. (1973) *J.C.S. Chem. Comm.*, 185-186.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. et Scrempt H. (1985) *A laboratory manual*, The John Innes Fondation, Norwich, England.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Janssen G. R., Malpartida F. et Smith C. (1986b) *In Regulation of gene expression - 25 years on* (ed. I; A. Booth C; F. Higgins), 251-276.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd A. M., Floss H. G. et Omura S. (1985a) *Nature*, **314** : 642-644.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H. et Omura S. (1985b) *In Microbiology* (ed S. Silver). *American Society for Microbiology, Washington D. C.*, 409-413.
- Hopwood D. A., Malpartida F. et Chater K. F. (1986a) *In Regulation of secondary metabolite formation*. (eds. H. Kleinkauf, H. von Hohren, H. Dornauer G. Nesemann), 22-33.
- Hoshino T., Ikeda T., Tomizuka N. et Furukawa K. (1985) *Gene*, **37** : 131-138.

- Hutchinson C. R., Borell C. W., Otten S. L., Stutzman-Engwall K. J. et Wang Y. (1989) *J. Med. Chem.*, 32 : 929-937.
- Ish-Horowitz D. et Burk J. F. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 2989-298.
- Kanehisa M. I. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12 : 203-215.
- Kay R. et McPherson J. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15 (6) : 2778.
- Khan S. A. et Novick R. (1983) *Plasmid*, 10 : 251-259.
- Kingston D. G. I., Kolpak M. X., Lefevre W. et Borup-Grochtmann I. B. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105 : 5106-5110.
- Kyte J. et Doolittle R. (1982) *J. Biol. Mol.*, 157 : 105-135.
- Low B. (1968) *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, 60 : 160.
- Lydiate D. J., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1985) *Gene*, 35 : 223-235.
- Maniatis T., Fritsh E. F. et Sambrook J. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Meinkoth J. et Wahl G. (1984) *Anal. Biochem.*, 138 : 267-284.
- Messing J., Crea R. et Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309.
- Neal R. J. et Chater K. F. (1987) *Gene*, 58 : 229-241.
- Ohnuki T., Imanaka T. et Aiba S. (1985) *J. Bacteriol.*, 164 : 85-94.
- Rusnak F., Sakaitani M., Drueckhamer D., Reichert J. et Walsh C. T. (1991) *Biochemistry*, 30 : 2916-2927.
- Sawadogo M. et Van Dyke M. W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 674.
- Staad J. F., Elkins M. F. et Earhart C. F. (1989) *FEMS Microbial. Lett.*, 59 : 15-20.
- Staden R. et McLachlan A. D. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10 : 141-156.
- Videau D. (1982) *Path. Biol.*, 30 : 529-534.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5392 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGATCCTGGC GTCCGCCGTC AAGAACTGAA CCGAGGGAGAC ACCCACCATG ACCGCACCCC	60
GCCGGCGCAT CACCCCTGCC GGCATCATCG ACGGCCCCGG CGGCCATGTG GCCGCCCTGGC	120
GCCACCCGGC GACCAAGGCG GACGCCAGC TCGACTTCGA ATTCCACCGC GACAACGCC	180
GCACCCCTCGA ACGCGGCCCTG TTGACGCCCG TGTTCATCGC GGACATCGTC GCCGTGTGGG	240
GCACCCGCCT GGACTCCCTG TGCCGCACCT CGCGCACCGA GCACCTCGAA CCGCTCACCC	300
TGCTCGCCGC CTACGCCCGC GTCACCGAGC ACATCGGCCT GTGCGCCACC GCCACCAACCA	360
CGTACAAACGA ACCGGCGCAC ATCGCCGCC GCTTCGCCTC CCTCGACCAAC CTCAGCGCG	420
GCCGGGGCGG CTGGAACGTC GTCACCTCCG CCGCACCGTG GGAGTCCGCC AACTTCGGCT	480
TCCCCGAGCA CCTGGAGCAC GGCAAACGCT ACGAGCGGGC CGAGGAGTTC ATCGACGTCG	540

TCAAAAAACT	GTGGGACAGC	GACGGCCGCC	CCGTCGACCA	CCGCAGGCACC	CACTTCGAGG	600
CCCCCGGCC	GCTCGGGATC	CCCCGCC	CGCAGGGCCG	CCCCGTCATC	ATCCAGGCCG	660
GCTCCTCGCC	GGTGGGACGC	GAGTTGCCG	CCCGGCACGC	CGAGGTCATC	TTCACCCGGC	720
ACAACCGGCT	CTCCGACGCC	CAGGACTTCT	ACGGCAGCCT	CAAGGCACGC	GTCGCCCGGC	780
ACGGCCGCGA	CCCCGAGAAG	GTCCTCGTGT	GGCCGACCCCT	CGCGCCGATC	GTCGCCGCCA	840
CCGACACCGA	GGCGAAGCAG	CGCCTGCAGG	AACTGCAGGA	CCTCACCCAC	GACCATGTCG	900
CCCTGCGCAC	CCTTCAGGAC	CACCTCGGCG	ACGTCGACCT	GAGCGCGTAC	CCGATCGACG	960
GGCCCCTCCC	CGACATCCCG	TACACCAACC	AGTCCCAGTC	GACGACCGAG	CGGCTGATCG	1020
GCCTGGCCAG	GCGCGAGAAC	CTCAGCATCC	GCGAGCTGGC	CCTGCGGCTG	ATGGGCGACA	1080
TCGTCGTCGG	CACACCGGAG	CAGCTGCCG	ACCACATGGA	GAGCTGGTTC	ACCGGCCGCG	1140
GCGCCGACGG	CTTCAACATC	GACTTCCGT	ACCTGCCGGG	CTCCGCCGAC	GACTTCGTCG	1200
ACCACGTGGT	GCCCCGAAC	CAGCGCCGCG	GCCTGTACCG	CTCGGGCTAC	GAGGGCACCA	1260
CCCTGCGGGC	CAACCTCGGC	ATCGACGCC	CCCCGAAGGC	AGGTGCAGCG	GCTTGACTTC	1320
CGTCCTAAAG	GCAGGGGATT	CCAGCGTCG	CCCCCTGGGG	TTCCCTGCTTC	ACCGACGACC	1380
GCCCCGTCCC	GGAGGACTCC	CGTTGAGGTC	TTATACCGTC	TCCACAGGCC	GACGCCGCCA	1440
GCCCCGGCGC	CAGGATGTTG	CGTGCCCAT	TCACGTCGCG	GTCATGCACA	GCGCCGCAGT	1500
CGCACGTCCA	CTCCCGGACG	TTCAGGGCA	GCTTCCCGCG	GACCGTGCCG	CAGGTTCCGC	1560
ACAGCTTGGA	GCTGGGAAC	CAGCGGTGA	TCACGACGAG	TTCGCGCCCA	TACCAGGCGC	1620
ACTTGTACTC	CAGCATGGAG	CGCAGTTCCG	TCCAGGCCGC	GTCGGAGATG	GCGCCGCAGA	1680
GCTTGCCGTT	CTTCAGCAGG	TTGCGGACGG	TGAGGTCTC	GATCACGACC	GTTTGGTTCT	1740
CACGGACGAG	TCGAGTCGAC	AGCTTGTGGA	GGAAGTCGCA	GCGCCGGTCG	GTGATCCGGG	1800
CGTGGACGCG	GGCGACCTTG	CGGCGGGCTT	TCTTCCGGTT	CGCCGACCCC	TTCGCCITTGC	1860
GCGACACGTC	CCGCTGAGCC	TTCGCGAGGC	GGGCGCGGTC	ACGGCGCTCG	TGCTTGGGTT	1920
TGGTGATCTT	CTCCCCGGTG	GACAGGGTCA	CCAGGGAGGT	GATCCCAGCG	TCGATGCCGA	1980
CGGCCGCCGT	GGTGGCGGGC	GGGGGGGTGA	TGGTGTCTC	GCACAGCAGG	GACACGAACC	2040
AGCGGGCCGC	ACGGTCGCCG	GACACGGTCA	CCGTCGTCGG	CTCCGCCCC	TCGGGAAGGG	2100
GACGGGACCA	GCGGATGTCC	AGGGGCTCCG	CGGTCTTC	CAGCGTGAGC	TGTCCGTTAC	2160
GCCACGTGAA	GGCGCTGCCG	GTGTACTCGG	CCGACGCCCT	GGACTTTTC	CGCGACTTGT	2220
ACCGCGGGTA	CTTCGACCGC	TTGGCGAAGA	AGTTGGCGAA	CGCCGTCTGC	AAGTGCCGCA	2280
GCGCCTGCTG	GAGCGGGACG	GAGGACACCT	CCGAGAGGAA	GGCGAGTTCT	TCGGTCTTCT	2340
TCCACTCCGT	CAGCGCGGGCG	GACGACTGCA	CGTAGGAGAC	CCGGCGCTGC	TCGCCGTACC	2400

AGGCTCGCGT	GCGCCCCCTCA	AGCGCCTTGT	TGTACACGAG	GCGGACACAG	CCGAACGTGC	2460	
GGGACAGCTC	AGCCGGCTGC	TCGTCCGTGG	GATAAAAGCG	GTACTTGAAA	GCCCCGCTTGA	2520	
CCTGCTGCAT	CACGCCTCAC	ACGCTATCAG	TTCCCGTGTG	AGCGGCGGGT	GTCTGCCGGT	2580	
GGTTGCAGAC	GCCGAACCGC	CCTGGCGGCG	ATTCGCCCAT	CCCTGCCCTG	CTCCCGAAGA	2640	
GCTTCGTCTC	CTCCCCGGTC	TGAAGGCCGG	GGTATCCACG	AAGGAATTCT	GATGACCGCG	2700	
CCCATCCTCG	TCGCCACCCCT	CGACACCCGC	GGCCCCGCG	CCACCCCTCGG	CACGATCACC	2760	
CGCGCCGTGC	GGGCCGCGGA	GGCCGCCCGA	TTCGACGCCG	TCCTGATCGA	CGACCGGGCC	2820	
GCCGCCGGCG	TCCAGGGCCG	GTTCGAGACG	ACGACGCTGA	CCGCCGCGCT	GGCCGCCGTC	2880	
ACCGAGCACA	TCGGCCTGAT	CACCGCCCCG	CTCCCGGCCG	ACCAGGCC	CTACCACGTG	2940	
TCCCCGGATCA	CCGCCTCGCT	CGACCACCTC	GCCCACGGCC	GCACCGGCTG	GCTCCGAGC	3000	
ACGGACACCA	CCGACCCCCA	GGGCCCCACC	GGCGAACTCA	TCGACGTCGT	CCGCCGGCCTG	3060	
TGGGACAGCT	TCGACGACGA	CGCCTTCGTC	CACGACCGCG	CCGACGGCCT	GTACTGGCGG	3120	
CTGCCCGCCG	TCCACCAACT	CGACCACCAAG	GGCAGGCACT	TCGACGTGGC	CGGCCCTCCTC	3180	
AACGTCGCC	GCCCCGCCGA	GGGCCACCCC	GTGTCGCCG	TCACCGGCC	CGCCCTCGCC	3240	
GC GGCCGCCG	ACCTCGTCCT	GCTCGACGAG	GC GGCCGACG	CCGCCCTCGGT	GAAGCAGCAG	3300	
GCACCGCACG	CCAAGATCCT	CCTGCCGCTG	CCCCGCCCGG	CCGCCGA	CTGCCGCCAC	3360	
AGCCCCGCCG	ACGGCTTCAC	GGTGGCGCTC	ACCGGCTCCG	ACGACCCGGT	CCTGCCGCCG	3420	
CTGCCGCC	GGCCCGGCCG	CCCCGACCGC	ACCGGCC	CCACCCCTGCG	CGAACGCCCTG	3480	
GGCCTGGCCC	GCCCCGAGAG	CCGCCACGCC	CTCACCAACG	CCTGACGACC	CGTCCGCCCG	3540	
CTGCTTCCTG	GAGAGTCATG	TCCCCTCGCC	TGTTCACCTC	GGAGTCCGTG	ACCGAGGGCC	3600	
ACCCCCACAA	GATGCCGAC	CAGATCAGTG	ACACCGTCCT	CGACGCCCTG	CTGCCGCCAGG	3660	
ACCCCCCCTC	ACCGCTCGCG	GTGAGACCC	TGATCACCA	CGGCCAGGTC	CACATGCCG	3720	
GCGAGGTCAC	CACCAAGGCG	TACGCC	TCGCCCAACT	GGTCCCGC	ACGATCCTGG	3780	
CCATCGGCTA	CGACTCGTCC	GCCAAGGGCT	TCGACGCC	CTCC	GTCTCCGTCT	3840	
CCATCGGCCG	GCAGTCCCCG	GACATGCC	AGGGCGTCGA	CAGGCC	CTAC GAGCCG	3900	
TCGAGGGCGA	GGACGACGAG	CTCGACCAGC	AGGGCGCCGG	CGACCAGGGC	CTGATGTTCG	3960	
GCTACGCCAC	CGACGAGACC	CCCTCGCTGA	TGCCGCTGCC	CATCGAGCTC	GCCCACCGCC	4020	
TCTCGGCCG	GCTCACCGAG	GTCCGCAAGG	ACGGCACCGT	CCCCTACCTG	CGCCCCGACG	4080	
GCAAGACCA	GGTCACCATC	GAGTACCAAGG	GCAGGCC	GGTGCGCC	GACACCGTCG	4140	
TCGTCTCCTC	CCAGCACGCC	GCCGACATCG	ACCTCGC	CCTGCTCACC	CCCCACATCC	4200	
GCGAGCACGT	CGTCGAGCAC	GTCCTCGCCG	CACTCGCCGA	GGACGGC	ATC AAGCTCGAGA	4260	
CGGACAAC	ACTA	CCGCC	CTGCTG	GTCAACCCGA	CCGGCCGTTT	CGAGATCGGC	4320

GCGACGCCGG	CCTGACCGGC	CGCAAGATCA	TCATCGACAC	GTACGGCGGC	ATGGCCCGCC	4380-
ACGGCGGTGG	CGCGTTCTCC	GGCAAGGACC	CGTCCAAGGT	CGACCGTTCC	GCCGCGTACG	4440
CGATGCGCTG	GGTCGCCAAG	AACGTCGTCG	CCGCGGGCCT	CGCCTCCCGC	TGCGAGGTCC	4500
AGGTGCCCTA	CGCCATCGGC	AAGGCCGAGC	CGGTGGGCCT	GTTCGTGAG	ACGTTGGCA	4560
CCGGCACCGT	CGCCCAGGAG	CGCATCGAGA	AGGCCATCAC	CGAGGTCTTC	GACCTGCGCC	4620
CCGCGGCCAT	CATCCGCGAC	CTCGACCTGC	TGCGGCCAT	CTACGCCGCC	ACCGCCGCC	4680
ACGGCCACTT	CGGCCCGCAA	CTGCCCAGCT	TCACCTGGGA	CGGGACCGAC	CGCGCCCA	4740
GGCTCAAGGC	CGCGGCCGGT	CTCTGAGCCG	GCCGGACCTG	TGAGGAGACC	TGACGTGCGC	4800
ATCGCTGTCA	CCGGTTCCAT	CGCCACCGAC	CATCTGATGG	TCTTCCCCGG	CCGGTTGCGC	4860
GATCAGCTGA	TCCCCGACCA	GCTCGCTCAT	GTCTCGCTCT	CCTTCCTGGT	CGACGCACTC	4920
GAGGTGCGCC	GGGGCGGAGT	GGCGGACAAC	GTCGCCCTCG	GCCTCGGCCG	CCTCGGCC	4980
ACCCCCCAGC	TGGTCGCCGC	CGTGGGCAGC	GACTTCGCCG	AGTACGAGGT	CTGGCTCAAG	5040
GAACACGGCG	TCGACACCGG	CCCCGTCCTG	GTCTCCACCG	AGCGGCAGAC	CGCCCGGTT	5100
ATGTGCATCA	CCGACCAGGA	CTCCAACCAG	ATCGCCTCCT	TCTACGCGGG	CGCCATGCAA	5160
GAGGCCCGCG	ACATCGACCT	GTGGCACCTG	ACCACCGGCA	CGCTCCGCC	CGACCTCGTC	5220
CTGGTCTGCC	CGAACGACCC	GGCGGCGATG	CTGCGCCACA	CGGGGAGTGC	CGCGAAACTG	5280
GGCCTGCCGT	TCGCCGCCGA	CCCCTCCCAG	CAGCTCGCCC	GCCTGGAGGG	AGGGAGGTAC	5340
GCGAACTCGG	TCGACGGGGC	CCGTTGGTTT	TTCACCAACG	AAGTACGAGG	CC	5392

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1269 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1269

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG ACC GCA CCC CGC CGG CGC ATC ACC CTC GCC GGC ATC ATC GAC GGC
 Met Thr Ala Pro Arg Arg Ile Thr Leu Ala Gly Ile Ile Asp Gly

1	5	10	15													
CCC	GGC	GGC	CAT	GTG	GCC	GCC	TGG	CGC	CAC	CCG	GCG	ACC	AAG	GCG	GAC	96
Pro	Gly	Gly	His	Val	Ala	Ala	Trp	Arg	His	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Asp	
20	25	30														
GCC	CAG	CTC	GAC	TTC	GAA	TTC	CAC	CGC	GAC	AAC	GCC	CGC	ACC	CTC	GAA	144
Ala	Gln	Leu	Asp	Phe	Glu	Phe	His	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	
35	40	45														
CGC	GGC	CTG	TTC	GAC	GCC	GTG	TTC	ATC	GCG	GAC	ATC	GTC	GCC	GTG	TGG	192
Arg	Gly	Leu	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Ile	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Val	Trp	
50	55	60														
GGC	ACC	CGC	CTG	GAC	TCC	CTG	TGC	CGC	ACC	TCG	CGC	ACC	GAG	CAC	TTC	240
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Leu	Cys	Arg	Thr	Ser	Arg	Thr	Glu	His	Phe	
65	70	75	80													
GAA	CCG	CTC	ACC	CTG	CTC	GCC	TAC	GCC	GCG	GTC	ACC	GAG	CAC	ATC	288	
Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Val	Thr	Glu	His	Ile	
85	90	95														
GGC	CTG	TGC	GCC	ACC	GCC	ACC	ACG	TAC	AAC	GAA	CCG	GCG	CAC	ATC	336	
Gly	Leu	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Tyr	Asn	Glu	Pro	Ala	His	Ile	
100	105	110														
GCC	GCC	CGC	TTC	GCC	TCC	CTC	GAC	CAC	CTC	AGC	GGC	GGC	CGG	GCC	GGC	384
Ala	Ala	Arg	Phe	Ala	Ser	Leu	Asp	His	Leu	Ser	Gly	Gly	Arg	Ala	Gly	
115	120	125														
TGG	AAC	GTC	GTC	ACC	TCC	GCC	GCA	CCG	TGG	GAG	TCC	GCC	AAC	TTC	GGC	432
Trp	Asn	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Trp	Glu	Ser	Ala	Asn	Phe	Gly	
130	135	140														
TTC	CCC	GAG	CAC	CTG	GAG	CAC	GGC	AAA	CGC	TAC	GAG	CGG	GCC	GAG	GAG	480
Phe	Pro	Glu	His	Leu	Glu	His	Gly	Lys	Arg	Tyr	Glu	Arg	Ala	Glu	Glu	
145	150	155	160													
TTC	ATC	GAC	GTC	GTC	AAA	AAA	CTG	TGG	GAC	AGC	GAC	GGC	CGC	CCC	GTC	528
Phe	Ile	Asp	Val	Val	Lys	Lys	Leu	Trp	Asp	Ser	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	
165	170	175														
GAC	CAC	CGC	GGC	ACC	CAC	TTC	GAG	GCC	CCC	GGC	CCG	CTC	GGG	ATC	GCC	576
Asp	His	Arg	Gly	Thr	His	Phe	Glu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Ile	Ala	
180	185	190														
CGC	CCC	CCG	CAG	GGC	CGC	CCC	GTC	ATC	ATC	CAG	GCC	GGC	TCC	TCG	CCG	624
Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Pro	Val	Ile	Ile	Gln	Ala	Gly	Ser	Ser	Pro	
195	200	205														
GTG	GGG	CGC	GAG	TTC	GCC	GCC	CGG	CAC	GCC	GAG	GTC	ATC	TTC	ACC	CGG	672
Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Arg	His	Ala	Glu	Val	Ile	Phe	Thr	Arg	
210	215	220														
CAC	AAC	CGG	CTC	TCC	GAC	GCC	CAG	GAC	TTC	TAC	GGC	GAC	CTC	AAG	GCA	720
His	Asn	Arg	Leu	Ser	Asp	Ala	Gln	Asp	Phe	Tyr	Gly	Asp	Leu	Lys	Ala	
225	230	235	240													
CGC	GTC	GCC	CGG	CAC	GGC	CGC	GAC	CCC	GAG	AAG	GTC	CTC	GTG	TGG	CCG	768
Arg	Val	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Lys	Val	Leu	Val	Trp	Pro	
245	250	255														
ACC	CTC	GCG	CCG	ATC	GTC	GCC	ACC	GAC	ACC	GAC	GAG	GCG	AAG	CAG	CGC	816

Thr Leu Ala Pro Ile Val Ala Ala Thr Asp Thr Glu Ala Lys Gln Arg		
260	265	270
CTG CAG GAA CTG CAG GAC CTC ACC CAC GAC CAT GTC GCC CTG CGC ACC		864
Leu Gln Glu Leu Gln Asp Leu Thr His Asp His Val Ala Leu Arg Thr		
275	280	285
CTT CAG GAC CAC CTC GGC GAC GTC GAC CTG AGC GCG TAC CCG ATC GAC		912
Leu Gln Asp His Leu Gly Asp Val Asp Leu Ser Ala Tyr Pro Ile Asp		
290	295	300
GGG CCC GTC CCC GAC ATC CCG TAC ACC AAC CAG TCC CAG TCG ACG ACC		960
Gly Pro Val Pro Asp Ile Pro Tyr Thr Asn Gln Ser Gln Ser Thr Thr		
305	310	315
GAG CGG CTG ATC GGC CTG GCC AGG CGC GAG AAC CTC AGC ATC CGC GAG		1008
Glu Arg Leu Ile Gly Leu Ala Arg Arg Glu Asn Leu Ser Ile Arg Glu		
325	330	335
CTG GCC CTG CGG CTG ATG GGC GAC ATC GTC GTC GGC ACA CCG GAG CAG		1056
Leu Ala Leu Arg Leu Met Gly Asp Ile Val Val Gly Thr Pro Glu Gln		
340	345	350
CTC GCC GAC CAC ATG GAG AGC TGG TTC ACC GGC CGC GGC GCC GAC GGC		1104
Leu Ala Asp His Met Glu Ser Trp Phe Thr Gly Arg Gly Ala Asp Gly		
355	360	365
TTC AAC ATC GAC TTC CCG TAC CTG CCG GGC TCC GCC GAC GAC TTC GTC		1152
Phe Asn Ile Asp Phe Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Ala Asp Asp Phe Val		
370	375	380
GAC CAC GTG GTG CCC GAA CTG CAG CGC CGC GGC CTG TAC CGC TCG GGC		1200
Asp His Val Val Pro Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly		
385	390	395
TAC GAG GGC ACC ACC CTG CGG GCC AAC CTC GGC ATC GAC GCC CCC CGG		1248
Tyr Glu Gly Thr Thr Leu Arg Ala Asn Leu Gly Ile Asp Ala Pro Arg		
405	410	415
AAG GCA GGT GCA GCG GCT TG		1269
Lys Ala Gly Ala Ala Ala		
420		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 422 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Thr Ala Pro Arg Arg Ile Thr Leu Ala Gly Ile Ile Asp Gly			
1	5	10	15
Pro Gly Gly His Val Ala Ala Trp Arg His Pro Ala Thr Lys Ala Asp			
20	25	30	
Ala Gln Leu Asp Phe Glu Phe His Arg Asp Asn Ala Arg Thr Leu Glu			
35	40	45	

Arg Gly Leu Phe Asp Ala Val Phe Ile Ala Asp Ile Val Ala Val Trp
 50 55 60
 Gly Thr Arg Leu Asp Ser Leu Cys Arg Thr Ser Arg Thr Glu His Phe
 65 70 75 80
 Glu Pro Leu Thr Leu Leu Ala Ala Tyr Ala Ala Val Thr Glu His Ile
 85 90 95
 Gly Leu Cys Ala Thr Ala Thr Thr Tyr Asn Glu Pro Ala His Ile
 100 105 110
 Ala Ala Arg Phe Ala Ser Leu Asp His Leu Ser Gly Gly Arg Ala Gly
 115 120 125
 Trp Asn Val Val Thr Ser Ala Ala Pro Trp Glu Ser Ala Asn Phe Gly
 130 135 140
 Phe Pro Glu His Leu Glu His Gly Lys Arg Tyr Glu Arg Ala Glu Glu
 145 150 155 160
 Phe Ile Asp Val Val Lys Lys Leu Trp Asp Ser Asp Gly Arg Pro Val
 165 170 175
 Asp His Arg Gly Thr His Phe Glu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Ile Ala
 180 185 190
 Arg Pro Pro Gln Gly Arg Pro Val Ile Ile Gln Ala Gly Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Gly Arg Glu Phe Ala Ala Arg His Ala Glu Val Ile Phe Thr Arg
 210 215 220
 His Asn Arg Leu Ser Asp Ala Gln Asp Phe Tyr Gly Asp Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Arg Val Ala Arg His Gly Arg Asp Pro Glu Lys Val Leu Val Trp Pro
 245 250 255
 Thr Leu Ala Pro Ile Val Ala Ala Thr Asp Thr Glu Ala Lys Gln Arg
 260 265 270
 Leu Gln Glu Leu Gln Asp Leu Thr His Asp His Val Ala Leu Arg Thr
 275 280 285
 Leu Gln Asp His Leu Gly Asp Val Asp Leu Ser Ala Tyr Pro Ile Asp
 290 295 300
 Gly Pro Val Pro Asp Ile Pro Tyr Thr Asn Gln Ser Gln Ser Thr Thr
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Ile Gly Leu Ala Arg Arg Glu Asn Leu Ser Ile Arg Glu
 325 330 335
 Leu Ala Leu Arg Leu Met Gly Asp Ile Val Val Gly Thr Pro Glu Gln
 340 345 350
 Leu Ala Asp His Met Glu Ser Trp Phe Thr Gly Arg Gly Ala Asp Gly
 355 360 365
 Phe Asn Ile Asp Phe Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Ala Asp Asp Phe Val
 370 375 380

Asp His Val Val Pro-Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Thr Thr Leu Arg Ala Asn Leu Gly Ile Asp Ala Pro Arg
 405 410 415
 Lys Ala Gly Ala Ala Ala
 420

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 834 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 1..834

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATG ACC GCG CCC ATC CTC GTC GCC ACC CTC GAC ACC CGC GGC CCC GCC	48
Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala	
1 5 10 15	
GCC ACC CTC GGC ACG ATC ACC CGC GCC GTG CGG GCC GCG GAG GCC GGC	96
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala	
20 25 30	
GGA TTC GAC GCC GTC CTG ATC GAC GAC CGG GCC GCC GGC GTC CAG	144
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Gly Val Gln	
35 40 45	
GGC CGG TTC GAG ACG ACG CTG ACC GCC GCG CTG GCC GCC GTC ACC	192
Gly Arg Phe Glu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Val Thr	
50 55 60	
GAG CAC ATC GGC CTG ATC ACC GCC CCG CTC CCG GCC GAC CAG GCC CCC	240
Glu His Ile Gly Leu Ile Thr Ala Pro Leu Pro Ala Asp Gln Ala Pro	
65 70 75 80	
TAC CAC GTG TCC CGG ATC ACC GCC TCG CTC GAC CAC CTC GCC CAC GGC	288
Tyr His Val Ser Arg Ile Thr Ala Ser Leu Asp His Leu Ala His Gly	
85 90 95	
CGC ACC GGC TGG CTC GCG AGC ACG GAC ACC ACC GAC CCC GAG GGC CGC	336
Arg Thr Gly Trp Leu Ala Ser Thr Asp Thr Thr Asp Pro Glu Gly Arg	
100 105 110	

ACC GGC GAA CTC ATC GAC GTC GTC CGC GGC CTG TGG GAC AGC TTC GAC	384
Thr Gly Glu Leu Ile Asp Val Val Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Asp	
115 120 125	
GAC GAC GCC TTC GTC CAC GAC CGC GCC GAC GGC CTG TAC TGG CGG CTG	432
Asp Asp Ala Phe Val His Asp Arg Ala Asp Gly Leu Tyr Trp Arg Leu	
130 135 140	
CCC GCC GTC CAC CAA CTC GAC CAC CAG GGC AGG CAC TTC GAC GTG GCC	480
Pro Ala Val His Gln Leu Asp His Gln Gly Arg His Phe Asp Val Ala	
145 150 155 160	
GGC CCC CTC AAC GTC GCC CGC CCG CAG GGC CAC CCC GTC GTC GCC	528
Gly Pro Leu Asn Val Ala Arg Pro Pro Gln Gly His Pro Val Val Ala	
165 170 175	
GTC ACC GGC CCC GCC CTC GCC GCG GCC GAC CTC GTC CTG CTC GAC	576
Val Thr Gly Pro Ala Leu Ala Ala Ala Asp Leu Val Leu Leu Asp	
180 185 190	
GAG GCG GCC GAC GCC GCC TCG GTG AAG CAG CAG GCA CCG CAC GCC AAG	624
Glu Ala Ala Asp Ala Ala Ser Val Lys Gln Gln Ala Pro His Ala Lys	
195 200 205	
ATC CTC CTG CCG CTG CCC GCC CCG GCC GAA CTG CCC GCC GAC AGC	672
Ile Leu Leu Pro Leu Pro Gly Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Asp Ser	
210 215 220	
CCC GCG GAC GGC TTC ACG GTG GCG CTC ACC GGC TCC GAC GAC CCG GTC	720
Pro Ala Asp Gly Phe Thr Val Ala Leu Thr Gly Ser Asp Asp Pro Val	
225 230 235 240	
CTG GCC GCG CTC GCC GCC CGG CCC GGC CGC CCG GAC CGC ACC GCG GCC	768
Leu Ala Ala Leu Ala Ala Arg Pro Gly Arg Pro Asp Arg Thr Ala Ala	
245 250 255	
ACC ACC CTG CGC GAA CGC CTG GGC CTG GCC CGC CCC GAG AGC CGC CAC	816
Thr Thr Leu Arg Glu Arg Leu Gly Leu Ala Arg Pro Glu Ser Arg His	
260 265 270	
GCC CTC ACC ACC GCC TG	834
Ala Leu Thr Thr Ala	
275	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 277 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala	
1 5 10 15	
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala	
20 25 30	
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Gly Val Gln	

35	40	45	
Gly Arg Phe Glu Thr Thr	Leu Thr Ala Ala	Leu Ala Val Thr	
50	55	60	
Glu His Ile Gly Leu Ile	Thr Ala Pro Leu Pro	Ala Asp Gln Ala Pro	
65	70	75	80
Tyr His Val Ser Arg Ile	Thr Ala Ser Leu Asp	His Leu Ala His Gly	
85	90	95	
Arg Thr Gly Trp Leu Ala	Ser Thr Asp Thr Thr	Asp Pro Glu Gly Arg	
100	105	110	
Thr Gly Glu Leu Ile Asp	Val Val Arg Gly Leu Trp	Asp Ser Phe Asp	
115	120	125	
Asp Asp Ala Phe Val His	Asp Arg Ala Asp Gly	Leu Tyr Trp Arg Leu	
130	135	140	
Pro Ala Val His Gln Leu	Asp His Gln Gly Arg	His Phe Asp Val Ala	
145	150	155	160
Gly Pro Leu Asn Val Ala	Arg Pro Pro Gln Gly	His Pro Val Val Ala	
165	170	175	
Val Thr Gly Pro Ala Leu	Ala Ala Asp Leu Val	Leu Leu Asp	
180	185	190	
Glu Ala Ala Asp Ala Ala	Ser Val Lys Gln Gln	Ala Pro His Ala Lys	
195	200	205	
Ile Leu Leu Pro Leu Pro	Gly Pro Ala Ala Glu	Leu Pro Ala Asp Ser	
210	215	220	
Pro Ala Asp Gly Phe Thr	Val Ala Leu Thr Gly	Ser Asp Asp Pro Val	
225	230	235	240
Leu Ala Ala Leu Ala Ala	Arg Pro Gly Arg Pro	Asp Arg Thr Ala Ala	
245	250	255	
Thr Thr Leu Arg Glu Arg	Leu Gly Leu Ala Arg	Pro Glu Ser Arg His	
260	265	270	
Ala Leu Thr Thr Ala			
275			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1209 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1209

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ATG TCC CGT CGC CTG TTC ACC TCG GAG TCC GTG ACC GAG GGC CAC CCC	48
Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro	
1 5 10 15	
GAC AAG ATC GCC GAC CAG ATC AGT GAC ACC GTC CTC GAC GCC CTG CTG	96
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Thr Val Leu Asp Ala Leu Leu	
20 25 30	
CGC GAG GAC CCC GCC TCA CGC GTC GCG GTC GAG ACC CTG ATC ACC ACC	144
Arg Glu Asp Pro Ala Ser Arg Val Ala Val Glu Thr Leu Ile Thr Thr	
35 40 45	
GGC CAG GTC CAC ATC GCC GGC GAG GTC ACC ACC AAG GCG TAC GCG CCC	192
Gly Gln Val His Ile Ala Gly Glu Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala Pro	
50 55 60	
ATC GCC CAA CTG GTC CGC GAC ACG ATC CTG GCC ATC GGC TAC GAC TCG	240
Ile Ala Gln Leu Val Arg Asp Thr Ile Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser	
65 70 75 80	
TCC GCC AAG GGC TTC GAC GGC GCC TCC TGC GGC GTC TCC GTC TCC ATC	288
Ser Ala Lys Gly Phe Asp Gly Ala Ser Cys Gly Val Ser Val Ser Ile	
85 90 95	
GGC GCG CAG TCC CCG GAC ATC GCC CAG GGC GTC GAC AGC GCC TAC GAG	336
Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu	
100 105 110	
ACC CGC GTC GAG GGC GAG GAC GAC GAG CTC GAC CAG CAG GGC GCC GGC	384
Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly	
115 120 125	
GAC CAG GGC CTG ATG TTC GGC TAC GCC ACC GAC GAG ACC CCC TCG CTG	432
Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu	
130 135 140	
ATG CCG CTG CCC ATC GAG CTC GCC CAC CGC CTC TCG CGC CGG CTC ACC	480
Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr	
145 150 155 160	
GAG GTC CGC AAG GAC GGC ACC GTC CCC TAC CTG CGC CCC GAC GGC AAG	528
Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys	
165 170 175	
ACC CAG GTC ACC ATC GAG TAC CAG GGC AGC CGC CCG GTG CGC CTG GAC	576
Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp	
180 185 190	
ACC GTC GTC GTC TCC TCC CAG CAC GCC GGC GAC ATC GAC CTC GGC TCC	624
Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser	
195 200 205	
CTG CTC ACC CCC GAC ATC CGC GAG CAC GTC GTC GAG CAC GTC CTC GCC	672
Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala	

210	215	220	
GCA CTC GCC GAG GAC GGC ATC AAG CTC GAG ACG GAC AAC TAC CGC CTG Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu 225 230 235 240			720
CTG GTC AAC CCG ACC GGC CGT TTC GAG ATC GGC GGC CCG ATG GGC GAC Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp 245 250 255			768
GCC GGC CTG ACC GGC CGC AAG ATC ATC GAC ACG TAC GGC GGC ATG Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met 260 265 270			816
GCC CGC CAC GGC GGT GGC GCG TTC TCC GGC AAG GAC CCG TCC AAG GTC Ala Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val 275 280 285			864
GAC CGT TCC GCC GCG TAC GCG ATG CGC TGG GTC GCC AAG AAC GTC GTC Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val 290 295 300			912
GCC GCG GGC CTC GCC TCC CGC TGC GAG GTC CAG GTC GCC TAC GCC ATC Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile 305 310 315 320			960
GGC AAG GCC GAG CCG GTC GGC CTG TTC GTC GAG ACG TTC GGC ACC GGC Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly 325 330 335			1008
ACC GTC GCC CAG GAG CGC ATC GAG AAG GCC ATC ACC GAG GTC TTC GAC Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp 340 345 350			1056
CTG CGC CCC GCG GCC ATC ATC CGC GAC CTC GAC CTG CTG CGG CCC ATC Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu Leu Arg Pro Ile 355 360 365			1104
TAC GCC GCC ACC GCC GCC TAC GGC CAC TTC GGC CGC GAA CTG CCC GAC Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp 370 375 380			1152
TTC ACC TGG GAG CGG ACC GAC CGC GCC CAC CGG CTC AAG GCC GCG GCC Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala 385 390 395 400			1200
GGT CTC TG Gly Leu			1209

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 402 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro

1	5	10	15
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Thr Val Leu Asp Ala Leu Leu			
20	25	30	
Arg Glu Asp Pro Ala Ser Arg Val Ala Val Glu Thr Leu Ile Thr Thr			
35	40	45	
Gly Gln Val His Ile Ala Gly Glu Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala Pro			
50	55	60	
Ile Ala Gln Leu Val Arg Asp Thr Ile Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser			
65	70	75	80
Ser Ala Lys Gly Phe Asp Gly Ala Ser Cys Gly Val Ser Val Ser Ile			
85	90	95	
Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu			
100	105	110	
Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly			
115	120	125	
Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu			
130	135	140	
Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr			
145	150	155	160
Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys			
165	170	175	
Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp			
180	185	190	
Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser			
195	200	205	
Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala			
210	215	220	
Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu			
225	230	235	240
Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp			
245	250	255	
Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met			
260	265	270	
Ala Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val			
275	280	285	
Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val			
290	295	300	
Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile			
305	310	315	320
Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly			
325	330	335	
Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp			

340	345	350
Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu	Leu Arg Pro Ile	
355	360	365
Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg	Glu Leu Pro Asp	
370	375	380
Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg	Leu Lys Ala Ala Ala	
385	390	395
Gly Leu		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1879 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 110..1858

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GATCGGGCTCC TGACGGAGCG CGCGCGCGCG GGCAGCGCGC ATCAGCGCG TGTCAACGGC	60
GCTGCCGACA CTGGGCGCGA CGCGAGGACG AAGCCGGAAA GGACCAACG ATG CTG	115
Met Leu	
1	
GAC GGA TGC GTT CCC TGG CCC GAG GAT GTG GCC GCG AAG TAC CGG GCG	163
Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr Arg Ala	
5	10
15	
GCC GGC TAC TGG CGG GGC GAG CCG CTG GGC ATG CTG CTG GGC CGC TGG	211
Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly Arg Trp	
20	25
30	
GCG GAG CAG TAC GGC GAG CGG GAG GCG CTG GTC GGC GCG GAC GGG TGC	259
Ala Glu Gln Tyr Gly Glu Arg Ala Leu Val Gly Ala Asp Gly Cys	
35	40
45	50
TCC CGT GTC ACC TAC CGT GCC CTG GAC CGC TGG TGC GAC CGG CTG GCG	307
Ser Arg Val Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Arg Trp Cys Asp Arg Leu Ala	
55	60
65	
GCG GGG TTC GCG GCG CGC GGG ATC GGC GCC GGC GAG CGG GTG CTG GTG	355
Ala Gly Phe Ala Ala Arg Gly Ile Gly Ala Gly Glu Arg Val Leu Val	

70	75	80	
CAG CTG CCG AAC ACG CCC GAG TTC GTC GCG GTG TGC TTC GCG CTG TTC Gln Leu Pro Asn Thr Pro Glu Phe Val Ala Val Cys Phe Ala Leu Phe 85	90	95	403
CGT CTG GGC GCG CTG CCG GTG TTC GCG CTG CCC GCG CAC CGT GCC GCC Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Ala Ala 100	105	110	451
GAG GTG GGG CAC CTG CTC GAG CTG TCC GGC GCC GTC GCC CAC ATC CTG Glu Val Gly His Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ala Val Ala His Ile Leu 115	120	125	499
CCG GGC ACC GGC ACC GGC TAC GAC CAT GTC GCG GCG GCC GTG GAG GCC Pro Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Asp His Val Ala Ala Ala Val Glu Ala 135	140	145	547
CGT GCC CGC CGT GCC CGC CCG GTG CAG GTG TTC GTG GCG GGC GAG GCG Arg Ala Arg Ala Arg Pro Val Gln Val Phe Val Ala Gly Glu Ala 150	155	160	595
CCC GCG GTG CTG CCC GAG GGG TTC ACC GCG CTG GCC GAC GTG GAC GGC Pro Ala Val Leu Pro Glu Gly Phe Thr Ala Leu Ala Asp Val Asp Gly 165	170	175	643
GAC CCG GTG GCG CCG GCG GAC GTG GAC GCC TTC CGA CGT GGC GTC TTC Asp Pro Val Ala Pro Ala Asp Val Asp Ala Phe Arg Arg Gly Val Phe 180	185	190	691
CTG CTG TCC GGG GGG ACG ACC GCG CTG CCG AAG CTG ATC CCG CGC ACC Leu Leu Ser Gly Gly Thr Thr Ala Leu Pro Lys Leu Ile Pro Arg Thr 195	200	205	739
CAC GAC GAC TAC GCC TAC CAG TGC CGG GTC ACG GCC GGT ATC TGC GGC His Asp Asp Tyr Ala Tyr Gln Cys Arg Val Thr Ala Gly Ile Cys Gly 215	220	225	787
CTG GAC GCG GAC AGT GTC TAT CTG GCG GTG CTG CCG GCC GAG TTC AAC Leu Asp Ala Asp Ser Val Tyr Leu Ala Val Leu Pro Ala Glu Phe Asn 230	235	240	835
TTC CCC TTC GGC TGC CCG GGC ATC CTG GGC ACC CTG CAC GCC GGC GGG Phe Pro Phe Gly Cys Pro Gly Ile Leu Gly Thr Leu His Ala Gly Gly 245	250	255	883
CGG GTG GTG TTC GCG CTG TCA CCG CAG CCC GAG GAG TGC TTC GCG CTG Arg Val Val Phe Ala Leu Ser Pro Gln Pro Glu Glu Cys Phe Ala Leu 260	265	270	931
ATC GAA CGC GAA CAC GTC ACC TTC ACC TCC GTC ATC CCC ACG ATC GTG Ile Glu Arg Glu His Val Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Ile Val 275	280	285	979
CAC CTG TGG CTG GCG GCC GCA CAA GGC CAC GGC CGC GAC CTG GGC His Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gln Gly His Gly Arg Asp Leu Gly 295	300	305	1027
AGC CTT CAG CTG CTG CAG GTC GGC AGC GCC AAA CTC CAC GAG GAG CTC Ser Leu Gln Leu Leu Gln Val Gly Ser Ala Lys Leu His Glu Glu Leu 310	315	320	1075
GCC GCC CGG ATC GGC CCC GAA CTG GGG GTG CGG CTG CAG CAG GTG TTC			1123

Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu Gly Val Arg Leu Gln Gln Val Phe			
325	330	335	
GGC ATG GCC GAG GGA CTG CTG ACC TTC ACC CGC GAC GAC GAC CCG GCG		1171	
Gly Met Ala Glu Gly Leu Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp Pro Ala			
340	345	350	
GAC GTG GTG CTG CGC ACC CAG GGC CGG CCG GTG TCC GAG GCC GAC GAG		1219	
Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala Asp Glu			
355	360	365	370
ATA CGC GTC GCC GAC CCC GAC GGC CGG CCC GTG CCC CGC GGT GAG ACC		1267	
Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly Glu Thr			
375	380	385	
GGT GAA CTG CTC ACC CGC GGC CCC TAC ACG CTG CGC GGC TAC TAC CGG		1315	
Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Arg			
390	395	400	
GCC CCC GAG CAC AAC GCC CGC GCG TTC ACC GAG GAC GGC TTC TAC CGC		1363	
Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe Tyr Arg			
405	410	415	
AGC GGC GAT CTG GTG CGG CTC ACC GCC GAC GGG CAG TTG GTG GTG GAG		1411	
Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val Val Glu			
420	425	430	
GGC AGG ATC AAG GAC GTC GTC ATC CGC GGC GGC GAC AAG GTC TCC GCG		1459	
Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Asp Lys Val Ser Ala			
435	440	445	450
ACC GAG GTC GAG GGC CAC CTG GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GCC		1507	
Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln Gln Ala			
455	460	465	
GCC GTC GTC GCC ATG CCC GAC CCG GTG TGG GGC GAG AAG GTC TGC GCC		1555	
Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val Cys Ala			
470	475	480	
TAC ATC GTG CCC GCA CCC GGC CGT CCC GCA CCG CCG ATG GCG GCG CTG		1603	
Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala Ala Leu			
485	490	495	
CGC CGG CTG CTG CGC GCG CGG GGA CTG GCC GAC TAC AAG CTT CCC GAC		1651	
Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu Pro Asp			
500	505	510	
CGG GTG GAG GTC GTC GAC GCG TTC CCG CTG ACC GGC CTC AAC AAG GTC		1699	
Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn Lys Val			
515	520	525	530
GAC AAG AAG GCC CTG GCG GCC GAC ATC GCC GCC AAG ACC GCC CCC ACC		1747	
Asp Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala Pro Thr			
535	540	545	
CGC CCC ACC ACC GCC GGC CAC GGC CCG ACC ACG GAC GGC GAT ACG GCC		1795	
Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp Thr Ala			
550	555	560	
GGT GGG GGT GGG TCC GCG GGC GGG GTG ACG GCC GCC GGT GGC GGG CGG		1843	
Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly Gly Arg			
565	570	575	

GAG GAG GCG GCG TGAGCGGGCC CGGGCCCGAG GGCG
 Glu Glu Ala Ala
 580

1879

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 582 acides amin,s
 (B) TYPE: acide amin,
 (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Met Leu Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly
 20 25 30

Arg Trp Ala Glu Gln Tyr Gly Glu Arg Glu Ala Leu Val Gly Ala Asp
 35 40 45

Gly Cys Ser Arg Val Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Arg Trp Cys Asp Arg
 50 55 60

Leu Ala Ala Gly Phe Ala Ala Arg Gly Ile Gly Ala Gly Glu Arg Val
 65 70 75 80

Leu Val Gln Leu Pro Asn Thr Pro Glu Phe Val Ala Val Cys Phe Ala
 85 90 95

Leu Phe Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Phe Ala Leu Pro Ala His Arg
 100 105 110

Ala Ala Glu Val Gly His Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ala Val Ala His
 115 120 125

Ile Leu Pro Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Asp His Val Ala Ala Ala Val
 130 135 140

Glu Ala Arg Ala Arg Ala Arg Pro Val Gln Val Phe Val Ala Gly
 145 150 155 160

Glu Ala Pro Ala Val Leu Pro Glu Gly Phe Thr Ala Leu Ala Asp Val
 165 170 175

Asp Gly Asp Pro Val Ala Pro Ala Asp Val Asp Ala Phe Arg Arg Gly
 180 185 190

Val Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Thr Ala Leu Pro Lys Leu Ile Pro
 195 200 205

Arg Thr His Asp Asp Tyr Ala Tyr Gln Cys Arg Val Thr Ala Gly Ile
 210 215 220

Cys Gly Leu Asp Ala Asp Ser Val Tyr Leu Ala Val Leu Pro Ala Glu
 225 230 235 240

Phe Asn Phe Pro Phe Gly Cys Pro Gly Ile Leu Gly Thr Leu His Ala
 245 250 255

Gly Gly Arg Val Val Phe Ala Leu Ser Pro Gln Pro Glu Glu Cys Phe
 260 265 270
 Ala Leu Ile Glu Arg Glu His Val Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr
 275 280 285
 Ile Val His Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gln Gly His Gly Arg Asp
 290 295 300
 Leu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Gln Val Gly Ser Ala Lys Leu His Glu
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu Gly Val Arg Leu Gln Gln
 325 330 335
 Val Phe Gly Met Ala Glu Gly Leu Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp
 340 345 350
 Pro Ala Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala
 355 360 365
 Asp Glu Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly
 370 375 380
 Glu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe
 405 410 415
 Tyr Arg Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val
 420 425 430
 Val Glu Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Gly Asp Lys Val
 435 440 445
 Ser Ala Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln
 450 455 460
 Gln Ala Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val
 465 470 475 480
 Cys Ala Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala
 485 490 495
 Ala Leu Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu
 500 505 510
 Pro Asp Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn
 515 520 525
 Lys Val Asp Lys Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala
 530 535 540
 Pro Thr Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp
 545 550 555 560
 Thr Ala Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly
 565 570 575
 Gly Arg Glu Glu Ala Ala
 580

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1833 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(v) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Streptomyces pristinaespiralis

(vi) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 103..1689

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GGATCCCCTC	GCCCAGGGCC	CTGGCGGGCC	CGCCGGGCCG	TGGGGGAGGT	GCGGGGCCG	60
CGGGCCCCGG	CACCGCACGA	ACAGAACAAAC	CGCTCCGGGC	CC ATG CGG ACT TCA	Met Arg Thr Ser	114
5	10	15	20	25	30	35
CGG TCC CAC GAC CAG CGG GCC CCT ACC CCC TGG AGA CAT CCC TTG CAC	Arg Ser His Asp Gln Arg Ala Pro Thr Pro Trp Arg His Pro Leu His	162				
5	10	15	20	25	30	35
AGC ACC CGG CCC GCG CCC GCG GCC GAC CGT GAC CCC AGG CGC TGG GTC	Ser Thr Arg Pro Ala Pro Ala Asp Arg Asp Pro Arg Arg Trp Val	210				
ATC CTC GGC GTG ATC TGC CTG GCC CAA CTC GTC GTC CTG CTC GAC AAC	Ile Leu Gly Val Ile Cys Leu Ala Gln Leu Val Val Leu Leu Asp Asn	258				
40	45	50				
ACC GTC CTC AAC GTC GCC ATC CCG GTG CTC ACC ACC GAC CTG GGC GCC	Thr Val Leu Asn Val Ala Ile Pro Val Leu Thr Thr Asp Leu Gly Ala	306				
55	60	65				
AGC ACC GCC GAC ATC CAG TGG ATG ATC AAC GCC TAC GCG CTC GTG CAG	Ser Thr Ala Asp Ile Gln Trp Met Ile Asn Ala Tyr Ala Leu Val Gln	354				
70	75	80				
TCC GGG CTG CTG CTC ACC GCG GGC AGC CTC GCG GAC CGC TAC GGC CGC	Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ser Leu Ala Asp Arg Tyr Gly Arg	402				
85	90	95	100			
AAA CGG CTG CTG ATG CTC GGA CTG GTG CTC TTC GGC GCC GGG TCC GCC	Lys Arg Leu Leu Met Ile Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ala	450				
105	110	115				
TGG GCG GCC TTC GCC CAG GAC TCC GCC CAA CTC ATC GCC GCC CGG GCC	Trp Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ala Gln Leu Ile Ala Ala Arg Ala	498				
120	125	130				

GGC ATG GGC GTG GGC GGG GCG CTG CTG GCG ACC ACC ACC CTC GCC GTC Gly Met Gly Val Gly Ala Leu Leu Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val 135 140 145	546
ATC ATG CAG GTC TTC GAC GAC GAC GAA CGC CCC CGG GCG ATC GGC CTG Ile Met Gln Val Phe Asp Asp Asp Glu Arg Pro Arg Ala Ile Gly Leu 150 155 160	594
TGG GGA GCG GCC AGC TCA CTG GGC TTC GCG CCC GGC CCG CTG CTC GGC Trp Gly Ala Ala Ser Ser Leu Gly Phe Ala Ala Gly Pro Leu Leu Gly 165 170 175 180	642
GGC GCC CTC CTC GAC CAC TTC TGG TGG GGC TCC ATC TTC CTG ATC AAC Gly Ala Leu Leu Asp His Phe Trp Trp Gly Ser Ile Phe Leu Ile Asn 185 190 195	690
CTG CCC GTC GCG CTG CTG GGC CTG CTG GCC GTC GCG CTG GTG CCC Leu Pro Val Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala Val Ala Arg Leu Val Pro 200 205 210	738
GAG ACG AAG AAC CCC GAA GGC CGG CGC CCC GAC CTG CTC GGC GCC GTG Glu Thr Lys Asn Pro Glu Gly Arg Arg Pro Asp Leu Leu Gly Ala Val 215 220 225	786
CTC TCC ACC CTC GGC ATG GTC GGC GTC GTC TAC GCC ATC ATC TCC GGC Leu Ser Thr Leu Gly Met Val Gly Val Val Tyr Ala Ile Ile Ser Gly 230 235 240	834
CCC GAA CAC GGC TGG ACG GCC CCG CAG GTC CTC CTG CCG GCC GCC GTC Pro Glu His Gly Trp Thr Ala Pro Gln Val Leu Leu Pro Ala Ala Val 245 250 255 260	882
GCG GCC GCG CTC ACC GCG TTC GTC CGC TGG GAA CTG CAC ACC CCC Ala Ala Ala Leu Thr Ala Phe Val Arg Trp Glu Leu His Thr Pro 265 270 275	930
CAC CCC ATG CTC GAC ATG GGC TTC ACC ACC GAC CGG CGC TTC AAC GGG His Pro Met Leu Asp Met Gly Phe Phe Thr Asp Arg Arg Phe Asn Gly 280 285 290	978
CCG TCG CCG GCG GAG TGC TCG TCG TTC GGC ATG GCC GGC TCG CTC TTC Pro Ser Pro Ala Glu Cys Ser Ser Phe Gly Met Ala Gly Ser Leu Phe 295 300 305	1026
CTG CTC ACC CAG CAC CTC CAA CTC GTC CTC GGC TAC GAC GCC CTG CAG Leu Leu Thr Gln His Leu Gln Leu Val Leu Gly Tyr Asp Ala Leu Gln 310 315 320	1074
GCC GGC CTG CGC ACC GCG CCA CTG GCT TTG ACG ATC GTC GCC CTC AAC Ala Gly Leu Arg Thr Ala Pro Leu Ala Leu Thr Ile Val Ala Leu Asn 325 330 335 340	1122
CTG GCC GGC CTC GCG AAA CTC CTC GCC GCG CTC GGC ACC GCC CGC Leu Ala Gly Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ala Ala Leu Gly Thr Ala Arg 345 350 355	1170
AGC ATC GCC CTG GGC ATG ACA CTG CTG GCC GCC GGC CTC AGC GCG GTG Ser Ile Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Ala Ala Gly Leu Ser Ala Val 360 365 370	1218
GCC GTC GGC GGA TCG GGC CCC GAC GCC GGC TAC GGC GGC ATG CTC GCC Ala Val Gly Ser Gly Pro Asp Ala Gly Tyr Gly Met Leu Ala	1266

375	380	385														
Gly			1314													
Leu	Leu	Leu														
Leu	Met	Gly														
390	395	400														
Gly																
Leu																
Leu																
Met																
Gly																
Ile																
Ala																
Leu																
Ala																
Met																
Pro																
Ala																
Met																
GCC	CTG	CTC	CTG	ATG	GCG	GGC	ATC	GCA	CTG	GCC	ATG	CCC	GCC	ATG	1314	
Ala	Thr	Ala	Val	Met	Ser	Ser	Ile	Pro	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Ala	Gly	
405	410	415	420													
GCG	GGC	GTG	CAG	GGC	ACC	CTG	ACC	GAG	TTC	GGC	GGC	GGA	CTG	GGA	GTG	1410
Ala	Gly	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	
425	430	435														
GCG	ATC	CTC	GGC	GTC	CTC	GGC	TCC	CGC	TTC	GCC	TCC	CAA	CTG	CCC	1458	
Ala	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Ala	Ser	Gln	Leu	Pro	
440	445	450														
GCC	GCC	ATC	ACC	GGC	ACC	GGC	TCC	CTC	GAC	GAG	GCA	CTG	CGC	GAC	GCC	1506
Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	Ala	
455	460	465														
ACA	CCC	CAA	CAG	GCC	GGG	CAG	GTC	CAC	GAC	GCG	TTC	GCC	GAC	GCG	GTG	1554
Thr	Pro	Gln	Gln	Ala	Gly	Gln	Val	His	Asp	Ala	Phe	Ala	Asp	Ala	Val	
470	475	480														
AAC	ACC	AGC	CAA	CTC	ATC	GGC	GCC	GCC	GTG	TTC	ACC	GGC	GGC	CTG	1602	
Asn	Thr	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Phe	Thr	Gly	Leu		
485	490	495	500													
CTC	GCC	GCG	CTG	CTG	CTG	CAC	CGC	GCC	GAC	CGC	AAG	GCC	GCC	CCC	CAG	1650
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Asp	Arg	Lys	Ala	Ala	Pro	Gln	
505	510	515														
CCC	ACC	GCC	CCC	ACC	CCC	GAA	CCC	ACC	ACC	ACC	GCC	TGACCCCCGG			1696	
Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala					
520	525															
CCCGCCGGGC	ACCCACACAAC	CCACGGCCCC	ACCCCTGCGG	CTCCCCACCG	GGACCCACAG	1756										
GGGCGGGGCC	GTGCCGCTGC	CCTGCCACCA	CACACAGCCC	CCACACACAC	AGCCCCCGCA	1816										
CGGCCGACAG	CGCCGGGG														1833	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 528 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Met	Arg	Thr	Ser	Arg	Ser	His	Asp	Gln	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Trp	Arg
1															15

His	Pro	Leu	His	Ser	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Asp	Arg	Asp	Pro
20														30

Arg	Arg	Trp	Val	Ile	Leu	Gly	Val	Ile	Cys	Leu	Ala	Gln	Leu	Val	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35

40

45

Leu Leu Asp Asn Thr Val Leu Asn Val Ala Ile Pro Val Leu Thr Thr
 50 55 60

Asp Leu Gly Ala Ser Thr Ala Asp Ile Gln Trp Met Ile Asn Ala Tyr
 65 70 75 80

Ala Leu Val Gln Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ser Leu Ala Asp
 85 90 95

Arg Tyr Gly Arg Lys Arg Leu Leu Met Leu Gly Leu Val Leu Phe Gly
 100 105 110

Ala Gly Ser Ala Trp Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ala Gln Leu Ile
 115 120 125

Ala Ala Arg Ala Gly Met Gly Val Gly Gly Ala Leu Leu Ala Thr Thr
 130 135 140

Thr Leu Ala Val Ile Met Gln Val Phe Asp Asp Asp Glu Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Ala Ile Gly Leu Trp Gly Ala Ala Ser Ser Leu Gly Phe Ala Ala Gly
 165 170 175

Pro Leu Leu Gly Gly Ala Leu Leu Asp His Phe Trp Trp Gly Ser Ile
 180 185 190

Phe Leu Ile Asn Leu Pro Val Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala Val Ala
 195 200 205

Arg Leu Val Pro Glu Thr Lys Asn Pro Glu Gly Arg Arg Pro Asp Leu
 210 215 220

Leu Gly Ala Val Leu Ser Thr Leu Gly Met Val Gly Val Val Tyr Ala
 225 230 235 240

Ile Ile Ser Gly Pro Glu His Gly Trp Thr Ala Pro Gln Val Leu Leu
 245 250 255

Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Leu Thr Ala Phe Val Arg Trp Glu
 260 265 270

Leu His Thr Pro His Pro Met Leu Asp Met Gly Phe Phe Thr Asp Arg
 275 280 285

Arg Phe Asn Gly Pro Ser Pro Ala Glu Cys Ser Ser Phe Gly Met Ala
 290 295 300

Gly Ser Leu Phe Leu Leu Thr Gln His Leu Gln Leu Val Leu Gly Tyr
 305 310 315 320

Asp Ala Leu Gln Ala Gly Leu Arg Thr Ala Pro Leu Ala Leu Thr Ile
 325 330 335

Val Ala Leu Asn Leu Ala Gly Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ala Ala Leu
 340 345 350

Gly Thr Ala Arg Ser Ile Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Ala Ala Gly
 355 360 365

Leu Ser Ala Val Ala Val Gly Gly Ser Gly Pro Asp Ala Gly Tyr Gly

370	375	380
Gly Met Leu Ala Gly Leu Leu Leu Met Gly Ala Gly Ile Ala Leu Ala		
385	390	395
Met Pro Ala Met Ala Thr Ala Val Met Ser Ser Ile Pro Pro Ala Lys		
405	410	415
Ala Gly Ala Gly Ala Gly Val Gln Gly Thr Leu Thr Glu Phe Gly Gly		
420	425	430
Gly Leu Gly Val Ala Ile Leu Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Phe Ala		
435	440	445
Ser Gln Leu Pro Ala Ala Ile Thr Gly Thr Gly Ser Leu Asp Glu Ala		
450	455	460
Leu Arg Asp Ala Thr Pro Gln Gln Ala Gly Gln Val His Asp Ala Phe		
465	470	475
Ala Asp Ala Val Asn Thr Ser Gln Leu Ile Gly Ala Ala Ala Val Phe		
485	490	495
Thr Gly Gly Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu His Arg Ala Asp Arg Lys		
500	505	510
Ala Ala Pro Gln Pro Thr Ala Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ala		
515	520	525

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
 - (a) tout ou partie des gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 4), snaC (SEQ ID n° 6), snbA (SEQ ID n° 8) et snbR (SEQ ID n° 10),
 - (b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,
 - (c) les séquences hybrideant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,
 - (d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.
3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les gènes snaA, snaB, snaC, snbA et snbR.
4. ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines.
5. ADN recombinant selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie des cosmides pIBV1 ou pIBV2 tels que représentés sur les figures 4 et 5 ou tout ou partie de séquences hybrideant avec les cosmides pIBV1 ou pIBV2 ou avec des fragments de ceux-ci.
6. Vecteur d'expression à réplication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3 ou un ADN recombinant selon l'une des revendications 4 et 5.
7. Vecteur selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le cosmide pIBV1 (figure 4), le cosmide pIBV2 (figure 5), le plasmide pVRC402 (figure 8(A)), le plasmide pVRC501 (figure 8(B)), le plasmide pXL2045 (figure 9), le plasmide pVRC505 (figure 10) et le plasmide pVRC507 (figure 11).

8. Cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique et/ou un ADN recombinant et/ou un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 8 et on récupère le polypeptide produit.

10. Utilisation d'une cellule recombinante selon la revendication 8 exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion.

11. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5 pour amplifier la production de Streptogramines.

12. Procédé de production de Streptogramines caractérisé en ce que :

- on introduit et/ou on amplifie dans une cellule productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences et/ou vecteurs selon l'une des revendications 1 à 7,
- on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et,
- on récupère les Streptogramines produites.

13. Procédé selon la revendication 12 pour la production de Pristinamycines, Mikamycines ou Virginiamycines.

14. Procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramine, une mutagénèse sur au moins un gène de la voie de biosynthèse.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la mutagénèse est effectuée in vitro ou in situ, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

16. Mutant d'un microorganisme producteur de Streptogramines caractérisé en ce qu'il possède une modification génétique au moins dans un gène impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

17. Procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

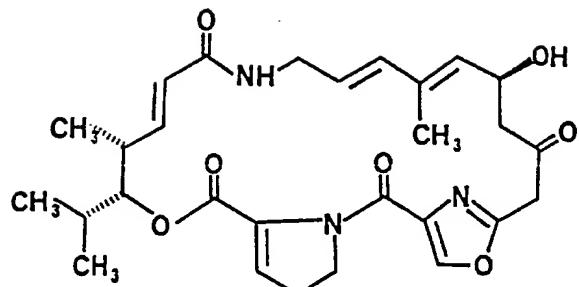
18. Procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines caractérisé en ce que :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et,
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

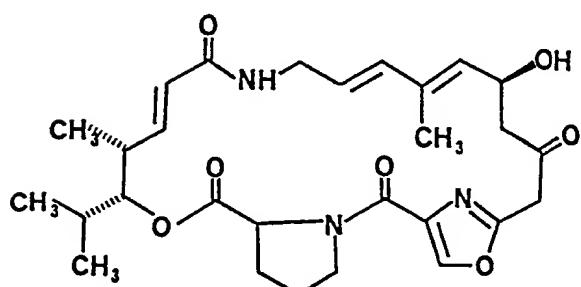
19. Utilisation d'une séquence et/ou d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 7 pour la préparation d'antibiotiques hybrides.

20. Polypeptide résultant de l'expression d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 5.

21. Polypeptide comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 3), SnaB (SEQ ID n° 5), SnaC (SEQ ID n° 7), SnbA (SEQ ID n° 9) et SnbR (SEQ ID n° 11) ou de dérivés de ceux-ci.



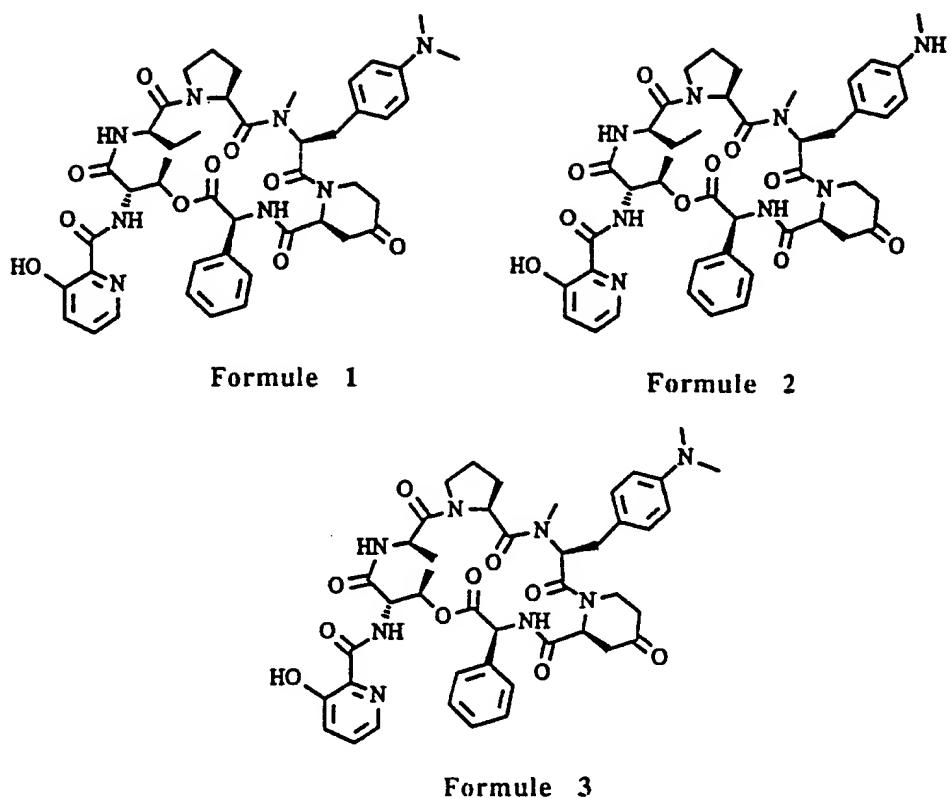
Formule 1



Formule 2

Formule 1	Formule 2
Pristinamycine IIA	Pristinamycine IIB
Mikamycine A	
Ostréogrycine A	Ostréogrycine G
Streptogramine A	
Synergistine A-I	
Vernamycine A	
Virginiamycine M1	Virginiamycine M2

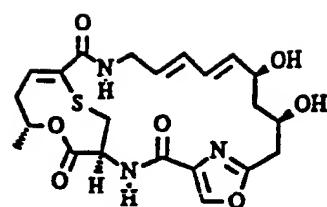
FIGURE 1



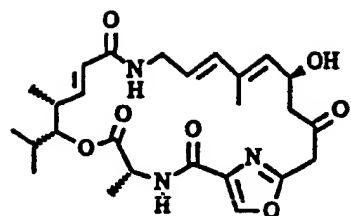
Formule 1	Formule 2	Formule 3
Pristinamycine IA Streptogramine B PA114B1 Vernamycine B α Ostréogrycine B Mikamycine IA	Pristinamycine IB	Pristinamycine IC Vernamycine B β Vernamycine B γ Ostréogrycine B1

FIGURE 2

A

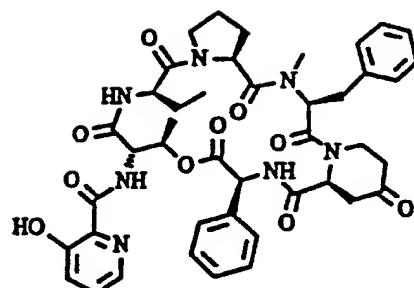
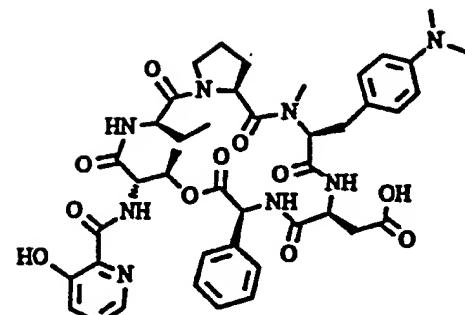


GRISEOVIRIDIN

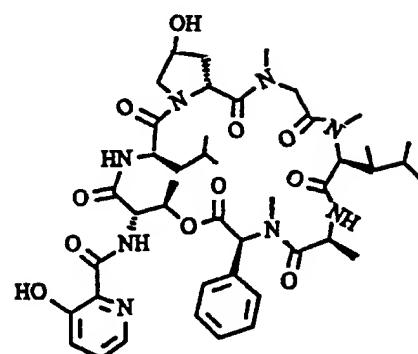


MADUMYCIN I

B

VIRGINIAMYCIN S₁

VERNAMYCIN C



ETAMYCIN

FIGURE 3

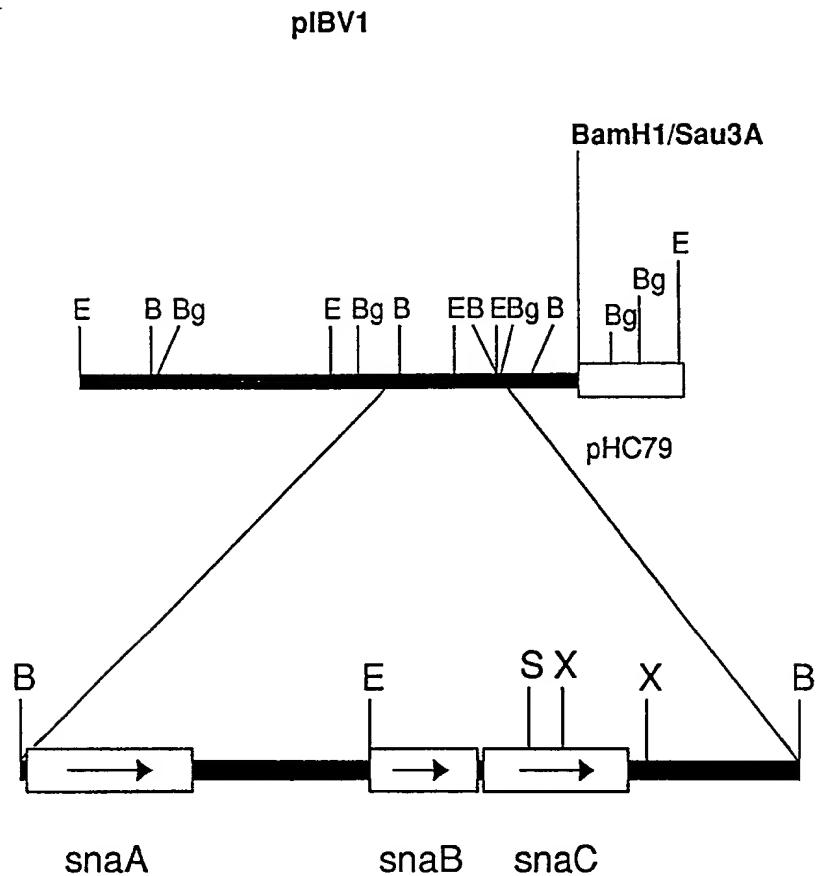


FIGURE 4

5/11

pIBV2

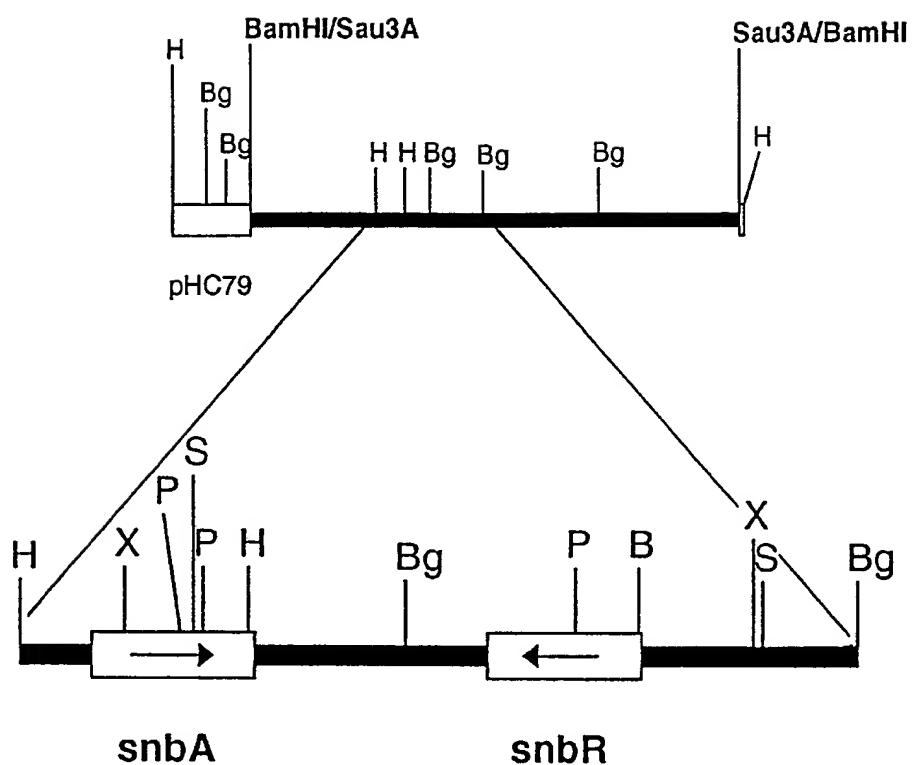


FIGURE 5

6/11

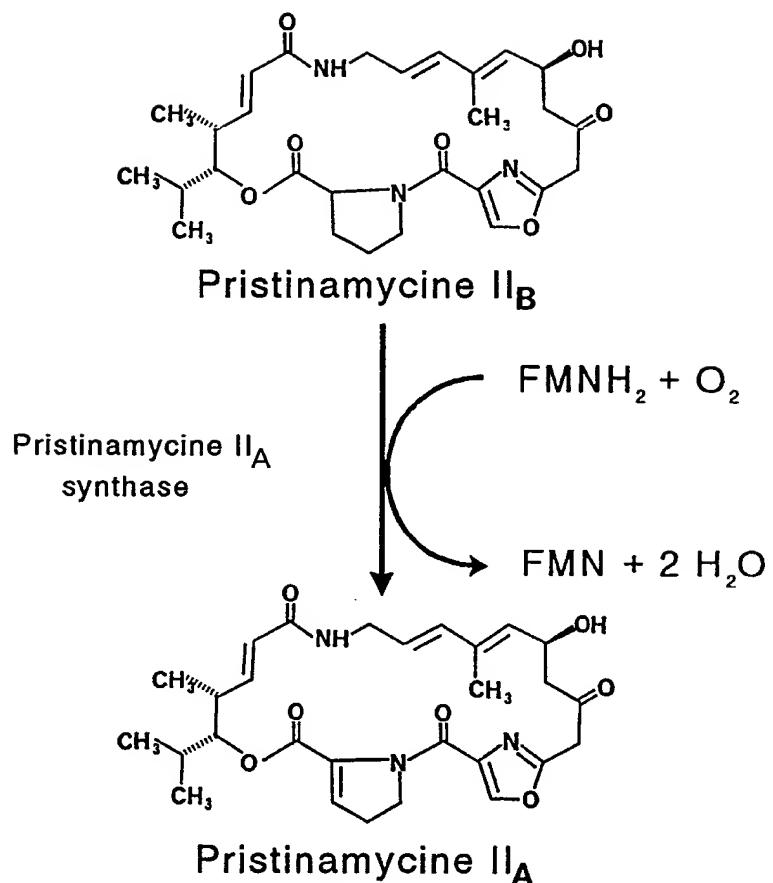


FIGURE 6

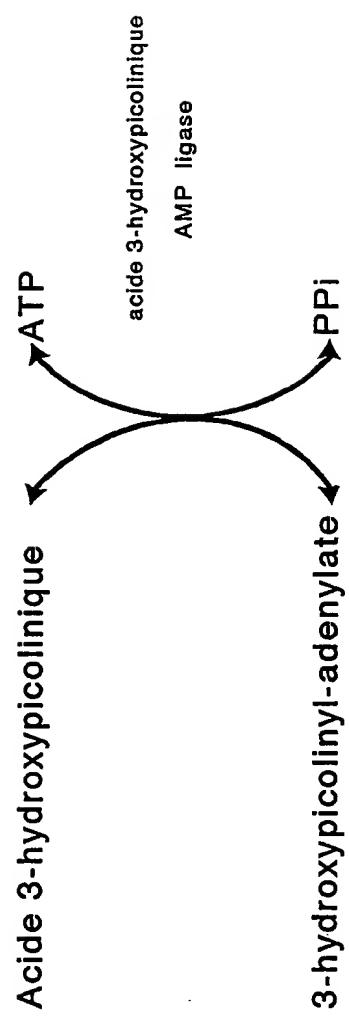


FIGURE 7

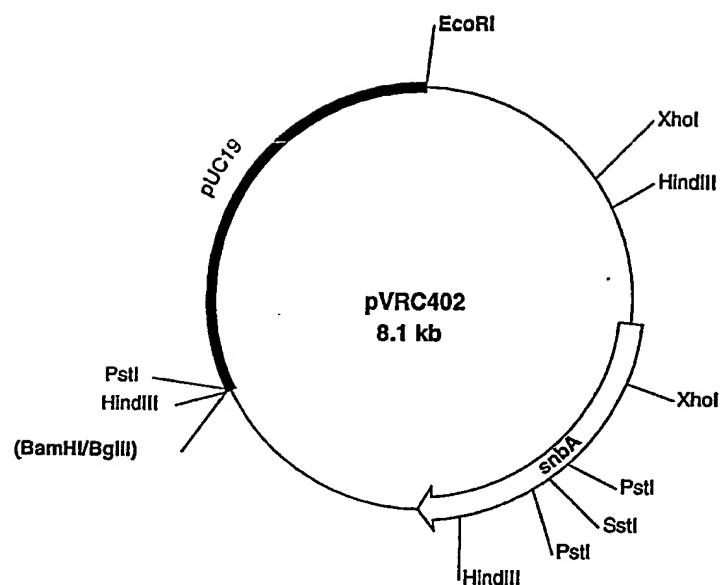


FIGURE 8 (A)

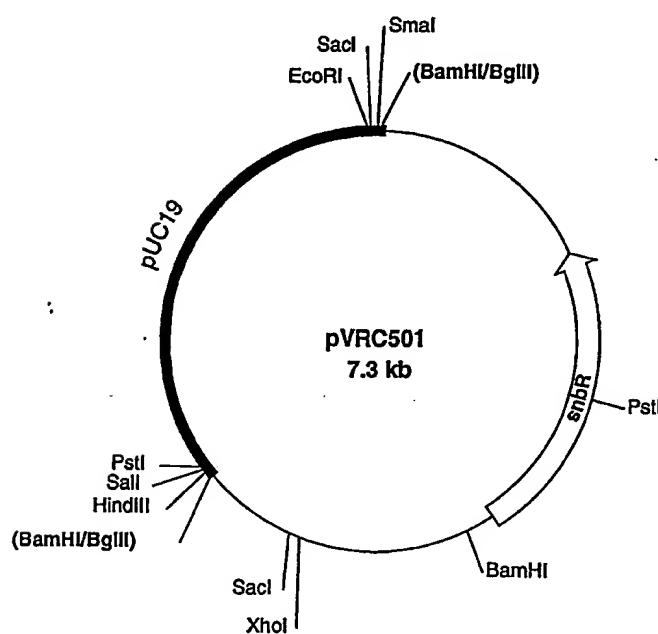


FIGURE 8 (B)

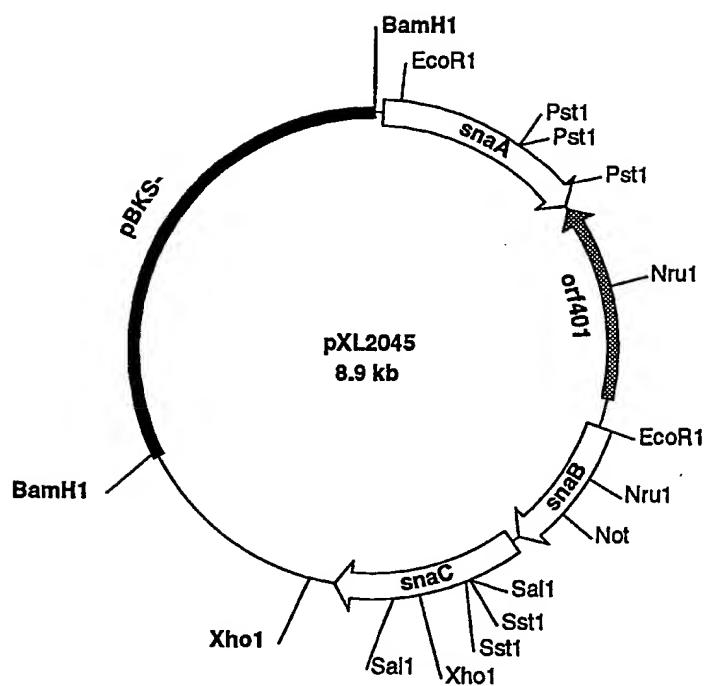


FIGURE 9

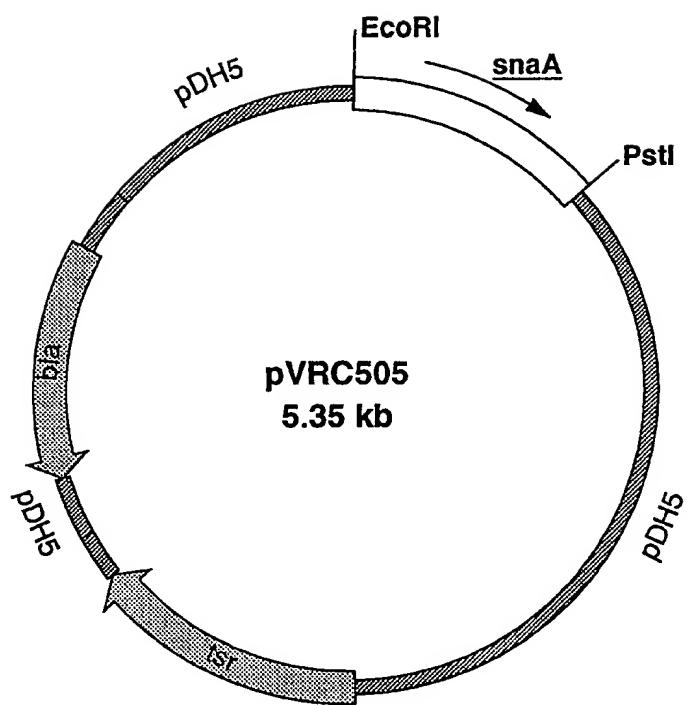


Figure 10

11/11

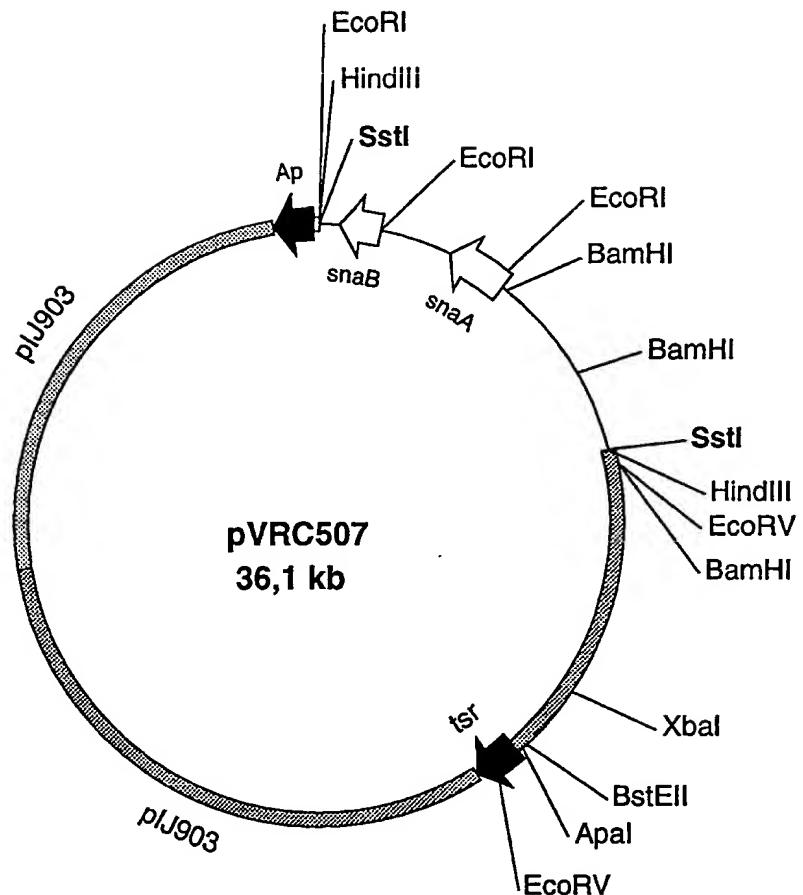


Figure 11

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2696189

N° d'enregistrement
nationalFR 9211441
FA 477042
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	BIOTECHNOLOGY vol. 8, Février 1990, NEW YORK US pages 115 - 121 KEITH F. CHATER ET AL 'The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomyces' * le document en entier * ---	1-21
D, A	GENE. vol. 74, 1988, AMSTERDAM NL pages 305 - 320 S. E. HALLAM ET AL 'Nucleotide sequence , transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor' ---	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9 Décembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 251978n, FUNANE, KAZUMI ET AL 'Isolation and properties of IMfactor (an inducer of secondary metabolite production)deficient mutants of Streptomyces virgineae MAFF 10-06014' page 453 ; colonne R ; * abrégé * & SHOKUHIN SOGO KENKYU HOKOKU vol. 55, 1991, pages 37 - 44 ---	14-16
X	DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES vol. 22, 1984, pages 695 - 720 A. M. BIOT 'Virginiamycin : properties , biosynthesis and fermentation' * page 703 * ---	16
1		-/-
Date d'achèvement de la recherche 02 JUILLET 1993		Examinateur LE CORNEC N.D.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2696189

N° d'enregistrement
nationalFR 9211441
FA 477042
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
P, X	<p>BIOTECHNOLOGY LETTERS vol. 14, no. 11, Novembre 1992, pages 1065 - 1070 V. PAQUET ET AL 'Induction of pristinamycins production in Streptomyces pristinaespiralis' * abrégé *</p> <p>-----</p>	14-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
1		
	Date d'achèvement de la recherche 02 JUILLET 1993	Examinateur LE CORNEC N.D.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant